

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 7 月 31 日 (31.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/062274 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C07K 14/47, (72) 発明者; および  
16/18, C12N 15/12, 15/63, 5/10, A61K 38/00, 39/00, (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宇野 裕美子  
48/00, G01N 33/53, C12P 21/02, 21/08 (UNO, Yumiko) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県つくば市松  
代 3 丁目 1 2 番地 1-6 0 1 号 Ibaraki (JP). 引地 由紀  
(HIKICHI, Yukiko) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県つく  
(21) 国際出願番号: PCT/JP03/00311 ば市松代 4 丁目 2 1 番地 2-1-5 0 4 号 Ibaraki (JP).  
(22) 国際出願日: 2003 年 1 月 16 日 (16.01.2003) 鷺谷 洋司 (SAGIYA, Yoji) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つく  
(25) 国際出願の言語: 日本語 ば市春日 1 丁目 7 番地 9-6 0 2 号 Ibaraki (JP). 中  
(26) 国際公開の言語: 日本語 西 淳 (NAKANISHI, Atsushi) [JP/JP]; 〒305-0025 茨城  
県つくば市花室 1 5 5 7-1 1 Ibaraki (JP).  
(30) 優先権データ: (74) 代理人: 高橋 秀一, 外 (TAKAHASHI, Shuichi et al.);  
特願 2002-10840 2002 年 1 月 18 日 (18.01.2002) JP 〒532-0024 大阪府 大阪市淀川区 十三本町 2 丁目  
特願 2002-15995 2002 年 1 月 24 日 (24.01.2002) JP 1 7 番 8 5 号 武田薬品工業株式会社大阪工場内 Os-  
\*特願 2002-25662 2002 年 2 月 1 日 (01.02.2002) JP aka (JP).  
特願 2002-25706 2002 年 2 月 1 日 (01.02.2002) JP (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
特願 2002-30015 2002 年 2 月 6 日 (06.02.2002) JP BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
特願 2002-33111 2002 年 2 月 8 日 (08.02.2002) JP DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
特願 2002-45058 2002 年 2 月 21 日 (21.02.2002) JP ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
特願 2002-46951 2002 年 2 月 22 日 (22.02.2002) JP LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,  
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品 OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ,  
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,  
LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市中央区 道修 ZM, ZW.  
町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).

[続葉有]

(54) Title: NOVEL PROTEINS AND DNAS THEREOF

(54) 発明の名称: 新規タンパク質およびその DNA

(57) Abstract: A novel sodium-dependent bile acid transporter protein, an Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange transporter protein, a P-type ATPase protein and a vanilloid receptor protein and polynucleotides encoding these proteins are useful in screening preventives/remedies for hyperlipemia, arteriosclerosis, genital diseases or digestive diseases; respiratory diseases, renal diseases or digestive diseases; pancreatic diseases, central nerve diseases, digestive diseases or respiratory diseases; inflammatory diseases, rheumatoid diseases or diabetic neurosis; etc.

(57) 要約:

本発明の新規なナトリウム依存性胆汁酸トランスポータタンパク質、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体タンパク質、P型ATPaseタンパク質ならびにバニロイド受容体タンパク質、これらのタンパク質をコードするポリヌクレオチドなどは、高脂血症、動脈硬化、生殖器疾患または消化器疾患; 呼吸器疾患、腎疾患または消化器疾患; 脾臓疾患、中枢神経系疾患、消化器疾患または呼吸器疾患; 炎症性疾患、リウマチ性疾患または糖尿病性神経症などの予防・治療剤のスクリーニングに有用である。



WO 03/062274 A1



(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

## 新規タンパク質およびそのDNA

## 5 技術分野

本発明は、新規なナトリウム依存性胆汁酸トランスポータタンパク質、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換輸送体タンパク質、P型ATPaseタンパク質ならびにバニロイド受容体タンパク質、これらのタンパク質をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドのアンチセンスポリヌクレオチド、これらのタンパク質に対する抗体、該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物または該タンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法、該スクリーニング方法で得られる化合物などを提供する。

## 背景技術

15 胆汁酸は肝臓において合成され、小腸に分泌されるが、小腸において脂質や脂溶性ビタミン、コレステロールなどの吸収を促すという重要な働きを担っている。胆汁酸は主に、小腸（回腸）から効率良く再吸収され、門脈を経て肝臓に戻り、再び胆汁中に排泄される（腸肝循環）。体内コレステロールプールサイズは、食事中的コレステロールだけでなく、腸肝循環の胆汁酸によってもフィードバック制御されることから、胆汁酸吸着薬（陰イオン交換樹脂）を用いた胆汁酸の腸における再吸収の抑制により、高コレステロール血症の治療が行われている。

ナトリウム依存性胆汁酸トランスポータは胆汁酸の運搬に寄与すると考えられている。ヒトでは、ナトリウム依存性胆汁酸トランスポータのアイソフォームが2つ同定されており、NTCP ( $\text{Na}^+/\text{taurocholate}$  cotransporting polypeptide) は主に肝臓で発現し (J. Clin. Invest., 93巻、1326-1331頁、1994年)、ISBT (Ileal sodium/bile salt cotransporter) は主に回腸・腎臓で発現している (J. Biol. Chem., 270巻、27228-27234頁、1995年)。ISBTに関しては、アミノ酸置換を伴う遺伝子の変異と胆汁酸吸収不良との直接的な関

連が示唆されている (J. Clin. Invest., 99巻, 1880-1887頁, 1997年)。

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体 (NHE) は、動物細胞においてNa<sup>+</sup>流入とカップルしてH<sup>+</sup>を排出する代表的なカチオンアンチポータである。NHEは10~13回の膜貫通領域を含む約500アミノ酸を含むアミノ末端側 (N) 領域と約300アミノ酸を含むカルボキシル末端側 (C) 領域の2つの大きな部分に分けられ、この全体の構造は各アイソフォームで共通である。前者はアミロライド結合部位を含むイオン輸送領域であり、後者は活性制御領域として機能することが知られている。

NHEのアイソフォームとして、ヒトではNHE1~3および5~7の6種が報告されている。NHE1は広範な組織に分布し、細胞内pH、細胞容積の調節に関わっている。NHE1の活性は増殖因子や高浸透圧刺激により亢進し、その結果、細胞内のpHが上昇する。NHE3は、腎臓や小腸に発現しており、Na<sup>+</sup>吸収に重要な役割を果たしているなど、アイソフォームごとにその発現分布、調節機構、阻害剤の作用が異なっていることが知られている。

NHE1は虚血後の細胞内のNa<sup>+</sup>濃度の上昇に関与しており、心筋の障害を引き起こす要因の一つと考えられている。さらに、高血圧の患者では、NHE1の活性が正常者に比較して優位に高いことも報告されている。また、てんかんの自然発症マウスにおいてNHEの変異が原因になっていることが確認されている (Cell 91巻, 139-148頁, 1997年)。

P型ATPaseは、ATP加水分解のエネルギーを利用して種々の基質の輸送を担う膜型酵素である。P型ATPaseは、その基質により3種類に分類されている。タイプ1は、Cu<sup>2+</sup>イオンやCd<sup>2+</sup>イオンなどの重金属を基質とし、N末端側に重金属との結合に関与する特徴的構造を持っており、8回膜貫通型の構造を有している。

Wilson病は、肝臓での銅の排泄に関わるCu<sup>2+</sup>-ATPaseの異常に伴う疾患である。

タイプ2は、アルカリ金属 (K<sup>+</sup>イオン、Na<sup>+</sup>イオン)、アルカリ土類金属 (Ca<sup>2+</sup>イオン) またはプロトン (H<sup>+</sup>) を基質とする。その中でも、胃酸分泌細胞におけるH<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (プロトンポンプ) は、胃潰瘍・十二指腸潰瘍・逆流性食道炎の治療薬であるプロトンポンプ阻害剤 (オメプラゾール、ランソプラゾールなど) の薬物標的である。また、Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (ナトリウムポンプ) は心疾患に使用されている強心配糖体の薬物標的であり、その活性はウバインにより阻



害される。タイプ3は、最も新しく同定されたタイプであり、アミノリン脂質を基質とする。アミノリン脂質トランスロカーゼ（フリッパーゼ）とも呼ばれ、ATP加水分解によって生じるエネルギーを用いて、特定のリン脂質を選択的に外層から内層に反転運動させる。これにより、生体膜の脂質の不均一な分布が保たれていると考えられている。タイプ2とタイプ3には構造上大きな差は認められず、ともに10回膜貫通型の構造を有している（Biochemistry、第34巻、15607-15613頁、1995年；Science、第272巻、1495-1497頁、1996年）。

これまで、タイプ3のP型ATPaseは哺乳動物で17種類のアイソフォームが同定されている。その中でも、FIC1は、膵臓、小腸、肝臓などの組織で発現し、その遺伝子の変異と遺伝性胆汁うっ滞との相関が報告されている（Nature Genet.、第18巻、219-224頁、1998年）。

タイプ3のP型ATPaseは、アミノリン脂質の運搬や生体膜における脂質の不均一な分布などに重要な役割を果たしていると考えられるが、各アイソフォームの詳細な機能や構造、および疾患との関連についてはまだそれほど明らかになっていない。

痛みの受容体であるパニロイド受容体サブタイプ1（VR1）は、外向き整流性を有するCa<sup>2+</sup>透過性の高い非選択性カチオンチャネルである。6回の膜貫通領域をもち、第5、第6膜貫通部位の間にポアを形成すると考えられるH5領域を有しており、N末端には3つのankyrin repeat domainを持つことが知られている。現在までにヒトではVR1（Biochemical and Biophysical Research Communications、281巻、1183頁、2001年）以外にVRL（vanilloid receptor-like protein）1とVRL2の2種がクローニングされているが、それぞれVR1に対して40%程のホモロジーを有している（Physiol Genomics 4巻、165-174頁、2001年）。

カプサイシンはvanillyl基を有することよりパニロイドと呼ばれており、パニロイド受容体の外来性のリガンドである。現在のところ内在性のリガンドは未だ明らかとはなっていない。VR1は、カプサイシンにより電気生理学的に直接活性化されることが、単一電流測定により明らかにされている。また、VR1はカプサイシンのような化学刺激のみならず、痛み刺激とされる熱刺激（ヒトで痛みを惹起する温度閾値である43℃以上）や酸刺激（炎症や虚血では組織は酸性

化している)でも活性化される多刺激受容体である

VR1は、カプサイシン、熱、プロトンなど生体内で痛みを惹起する刺激により活性化されるが、病的な状態ではこれらの刺激は単独ではなく、同時に存在していると考えられる。また生体での痛みの受容が全てVR1で説明されるわけではなく、他のホモログ、補助因子の存在も推定される。事実、現在までに報告済みのVRファミリーにおいても、発現部位、刺激感受性に多様性があり、それらが相互依存的に機能し合うことにより、痛みの刺激が伝達されることが考えられる。

ナトリウム依存性胆汁酸トランスポータは、肝臓や小腸における胆汁酸の運搬において重要な役割を果たしていると考えられているが、その詳細なメカニズムや疾患との関連についてはそれほど明らかにされていない。ナトリウム依存性胆汁酸トランスポータの詳細な基質特異性や胆汁酸代謝などにおける役割を解明することが、胆汁酸代謝などが関与する疾患の治療薬開発につながる。

上記のようにNHEは多くの病態に関与しており、NHEの各アイソフォームの活性化と調節のメカニズムを解明することが、治療薬開発につながる。

タイプ3のP型ATPaseの詳細な機能を明らかにすることが、代謝疾患、中枢神経疾患、生殖器疾患、癌などタイプ3のP型ATPaseが関与する疾患の治療薬開発につながる。

上記したカプサイシンは、糖尿病性神経症や関節リウマチの痛みを軽減する目的で鎮痛薬として使用されていることから、VRファミリーの構造や、機能、相互関係を明らかにすることにより、痛み全般に対する治療薬開発につながることが考えられる。

#### 発明の開示

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、新規ナトリウム依存性胆汁酸トランスポータタンパク質を見出した。該タンパク質はヒトISBTとアミノ酸レベルで44%の相同性を示し、エストロン硫酸およびデヒドロエピアンドロステロン硫酸が基質であることを見出し、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、新規な、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換輸送体タンパク質を見出した。該タンパク質のN末端側のアミノ酸707残基は、WO 02/04520号公報に記載のTRICH-21のアミノ酸配列と同一であった。該タンパク質を抑制する方法としては、例えば、 $\text{Na}^+$ や $\text{K}^+$ などのカチオンと $\text{H}^+$ の交換輸送を阻害したり、該タンパク質の転写を抑制して発現レベルを低下させることが考えられる。該タンパク質を賦活化する方法としては、例えば $\text{Na}^+$ や $\text{K}^+$ などのカチオンと $\text{H}^+$ の交換輸送を促進したり、該タンパク質のプロモーターを活性化したり、mRNAを安定化することで発現レベルを亢進することが考えられる。これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、新規P型ATPaseを見出した。このタンパク質はアミノ酸レベルで、タイプ3のP型ATPaseであるヒトP型ATPase 8A1 (ATP8A1) (Biochem. Biophys. Res. Commun.、第257巻、333-339頁、1999年)と67%、マウスP型ATPase 8A2 (ATP8A2)

(Physiol. Genomics (Online)、第1巻、139-150頁、1999年)と95%の相同性を示し、タイプ3のP型ATPaseとして機能し得るものである。該タンパク質を抑制する方法としては、例えば、アミノリン脂質の輸送を阻害したり、該タンパク質の転写を抑制して発現レベルを低下させることが考えられる。該タンパク質を賦活化する方法としては、例えばアミノリン脂質の輸送を促進したり、該タンパク質のプロモーターを活性化したり、mRNAを安定化することで発現レベルを亢進することが考えられる。これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、新規バニロイド受容体を見出した。このタンパク質はアミノ酸レベルで、ヒトバニロイド受容体サブタイプ1と43%の相同性を示し、バニロイド受容体として機能し得るものである。該タンパク質を抑制する方法としては、例えば、カチオンの透過を阻害したり、該タンパク質の転写を抑制して発現レベルを低下させることが考えられる。該タンパク質を賦活化する方法としては、例えばカチオンの透過を促進したり、該タンパク質のプロモーターを活性化したり、mRNAを安定

化することで発現レベルを亢進することが考えられる。これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：1、配列番号：14または配列番号：104で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、

(2) 配列番号：1または配列番号：14で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩、

(3) 配列番号：104で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩、

(4) 上記(1)記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、

(5) 上記(1)記載のタンパク質または上記(4)記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

(6) DNAである上記(5)記載のポリヌクレオチド、

(7) 配列番号：2、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：105または配列番号：112で表される塩基配列からなるDNA、

(8) 上記(5)記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

(9) 上記(8)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(10) 上記(9)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載のタンパク質または上記(4)記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(4)記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法、

(11) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(4)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、

(12) 上記(5)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

(13) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(4)記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、

(14) 上記(13)記載の抗体を含有してなる医薬、

(15) 上記(13)記載の抗体を含有してなる診断薬、

(16) 上記(5)記載のポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド、

(17) 上記(16)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

5 (18) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(4)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(4)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

10 (19) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(4)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性が、該タンパク質の基質の輸送活性である上記(18)記載のスクリーニング方法、

(19a) 基質が、ステロイドホルモンもしくはその代謝物または胆汁酸である上記(19)記載のスクリーニング方法、

(19b) 基質が、ステロイドホルモンまたはその代謝物である上記(19a)記載のスクリーニング方法、

15 (19c) ステロイドホルモンまたはその代謝物が、卵胞ホルモン、黄体ホルモン、男性ホルモン、ミネラルコルチコイドもしくはグルココルチコイドまたはその硫酸抱合体もしくはグルクロン酸抱合体である上記(19b)記載のスクリーニング方法、

20 (19d) ステロイドホルモンまたはその代謝物が、卵胞ホルモンもしくは男性ホルモンまたはその硫酸抱合体である上記(19b)記載のスクリーニング方法、

(19e) 基質が、エストロン、デヒドロエピアンドロステロンまたはこれらの硫酸抱合体である上記(19a)記載のスクリーニング方法、

25 (20) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(4)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(4)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(21) 上記(18)記載のスクリーニング方法または上記(19)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(1)記載のタンパク質もし

くは上記（４）記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩、

（２２） 上記（２１）記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（２３） 上記（５）記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、上記（１）記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（２４） 上記（５）記載のポリヌクレオチドを含有してなる、上記（１）記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

（２５） 上記（２３）記載のスクリーニング方法または上記（２４）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記（１）記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩、

（２６） 上記（２５）記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（２７） 高脂血症、動脈硬化、生殖器疾患または消化器疾患の予防・治療剤である上記（１１）、（１２）、（１４）、（１７）、（２２）または（２６）記載の医薬、

（２８） 哺乳動物に対して、上記（２１）または（２５）記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする高脂血症、動脈硬化、生殖器疾患または消化器疾患の予防・治療方法、

（２９） 高脂血症、動脈硬化、生殖器疾患または消化器疾患の予防・治療剤を製造するための上記（２１）または（２５）記載の化合物またはその塩の使用、

（３０） 配列番号：１８で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、

（３１） 配列番号：１８で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩、

（３２） 上記（３０）記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、

（３３） 上記（３０）記載のタンパク質または上記（３２）記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

(34) DNAである上記(33)記載のポリヌクレオチド、

(35) 配列番号：19または配列番号：41で表される塩基配列からなるDNA、

(36) 上記(33)記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

5 (37) 上記(36)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(38) 上記(37)記載の形質転換体を培養し、上記(30)記載のタンパク質または上記(32)記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採用することを特徴とする上記(30)記載のタンパク質もしくは上記(32)記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法、

10 (39) 上記(30)記載のタンパク質もしくは上記(32)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、

(40) 上記(33)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

(41) 上記(30)記載のタンパク質もしくは上記(32)記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、

15 (42) 上記(41)記載の抗体を含有してなる医薬、

(43) 上記(41)記載の抗体を含有してなる診断薬、

(44) 上記(33)記載のポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド、

(45) 上記(44)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

20 (46) 上記(30)記載のタンパク質もしくは上記(32)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、上記(30)記載のタンパク質もしくは上記(32)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(47) 上記(30)記載のタンパク質もしくは上記(32)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、上記(30)記載のタンパク質もしくは上記(32)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

25 (48) 上記(46)記載のスクリーニング方法または上記(47)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(30)記載のタンパク質も

しくは上記（３２）記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩、

（４９） 上記（４８）記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（５０） 上記（３３）記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、

5 上記（３０）記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（５１） 上記（３３）記載のポリヌクレオチドを含有してなる、上記（３０）記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

10 （５２） 上記（５０）記載のスクリーニング方法または上記（５１）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記（３０）記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩、

（５３） 上記（５２）記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（５４） 呼吸器疾患、腎疾患または消化器疾患の予防・治療剤である上記

15 （３９）、（４０）、（４２）、（４５）、（４９）または（５３）記載の医薬、

（５５） 哺乳動物に対して、上記（４８）または（５２）記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする呼吸器疾患、腎疾患または消化器疾患の予防・治療方法、

20 （５６） 呼吸器疾患、腎疾患または消化器疾患の予防・治療剤を製造するための上記（４８）または（５２）記載の化合物またはその塩の使用、

（５７） 配列番号：４２で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、

25 （５８） 配列番号：４２で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩、

（５９） 上記（５７）記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、

（６０） 上記（５７）記載のタンパク質または上記（５９）記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

（６１） DNAである上記（６０）記載のポリヌクレオチド、



(62) 配列番号：43、配列番号：60、配列番号：61または配列番号：62で表される塩基配列からなるDNA、

(63) 上記(60)記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

(64) 上記(63)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

5 (65) 上記(64)記載の形質転換体を培養し、上記(57)記載のタンパク質または上記(59)記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする上記(57)記載のタンパク質もしくは上記(59)記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法、

10 (66) 上記(57)記載のタンパク質もしくは上記(59)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、

(67) 上記(60)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

(68) 上記(57)記載のタンパク質もしくは上記(59)記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、

(69) 上記(68)記載の抗体を含有してなる医薬、

15 (70) 上記(68)記載の抗体を含有してなる診断薬、

(71) 上記(60)記載のポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド、

(72) 上記(71)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

20 (73) 上記(57)記載のタンパク質もしくは上記(59)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、上記(57)記載のタンパク質もしくは上記(59)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

25 (74) 上記(57)記載のタンパク質もしくは上記(59)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、上記(57)記載のタンパク質もしくは上記(59)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(75) 上記(73)記載のスクリーニング方法または上記(74)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(57)記載のタンパク質もしくは上記(59)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害

する化合物またはその塩、

(76) 上記(75)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(77) 上記(60)記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、  
上記(57)記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物または  
5 その塩のスクリーニング方法、

(78) 上記(60)記載のポリヌクレオチドを含有してなる、上記(5  
7)記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩  
のスクリーニング用キット、

(79) 上記(77)記載のスクリーニング方法または上記(78)記載の  
10 スクリーニング用キットを用いて得られる、上記(57)記載のタンパク質遺  
伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩、

(80) 上記(79)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(81) 膵臓疾患、中枢神経系疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・  
治療剤である上記(66)、(67)、(69)、(72)、(76)または  
15 (80)記載の医薬、

(82) 哺乳動物に対して、上記(75)または(79)記載の化合物また  
はその塩の有効量を投与することを特徴とする膵臓疾患、中枢神経系疾患、消  
化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療方法、

(83) 膵臓疾患、中枢神経系疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・  
20 治療剤を製造するための上記(75)または(79)記載の化合物またはその  
塩の使用、

(84) 配列番号：66で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同  
一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、

(85) 配列番号：66で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質または  
25 その塩、

(86) 上記(84)記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、

(87) 上記(84)記載のタンパク質または上記(86)記載の部分ペプ  
チドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

(88) DNAである上記(87)記載のポリヌクレオチド、

(89) 配列番号：67または配列番号：103で表される塩基配列からなるDNA、

(90) 上記(86)記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

(91) 上記(90)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

5 (92) 上記(91)記載の形質転換体を培養し、上記(84)記載のタンパク質または上記(86)記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする上記(84)記載のタンパク質もしくは上記(86)記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法、

10 (93) 上記(84)記載のタンパク質もしくは上記(86)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、

(94) 上記(87)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

(95) 上記(84)記載のタンパク質もしくは上記(86)記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、

(96) 上記(95)記載の抗体を含有してなる医薬、

15 (97) 上記(95)記載の抗体を含有してなる診断薬、

(98) 上記(87)記載のポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド、

(99) 上記(98)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

20 (100) 上記(84)記載のタンパク質もしくは上記(86)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、上記(84)記載のタンパク質もしくは上記(86)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

25 (101) 上記(84)記載のタンパク質もしくは上記(86)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、上記(84)記載のタンパク質もしくは上記(86)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(102) 上記(100)記載のスクリーニング方法または上記(101)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(84)記載のタンパク質もしくは上記(86)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進また

は阻害する化合物またはその塩、

(103) 上記(102)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(104) 上記(87)記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、  
上記(84)記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(105) 上記(87)記載のポリヌクレオチドを含有してなる、上記(84)記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(106) 上記(104)記載のスクリーニング方法または上記(105)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(84)記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩、

(107) 上記(106)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(108) 上記(84)記載のタンパク質もしくは上記(86)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする該タンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対するリガンドの決定方法、

(109) 上記(84)記載のタンパク質もしくは上記(86)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、リガンドと該タンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(110) 上記(84)記載のタンパク質もしくは上記(86)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、リガンドと該タンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(111) 上記(109)記載のスクリーニング方法または上記(110)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記(84)記載のタンパク質もしくは上記(86)記載の部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

(112) 上記(111)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(113) 炎症性疾患、リウマチ性疾患または糖尿病性神経症の予防・治療

剤である上記（９３）、（９４）、（９６）、（９９）、（１０３）、（１０７）または（１１２）記載の医薬、

（１１４） 哺乳動物に対して、上記（１０２）、（１０６）記載または（１１１）記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする炎症性疾患、リウマチ性疾患または糖尿病性神経症の予防・治療方法、

（１１５） 炎症性疾患、リウマチ性疾患または糖尿病性神経症の予防・治療剤を製造するための上記（１０２）、（１０６）または（１１１）記載の化合物またはその塩の使用などを提供する。

## 10 図面の簡単な説明

図１は、ヒトTCH230および回腸ナトリウム依存性胆汁酸トランスポータ（ISBT）のアミノ酸配列の比較を表す図である。図中、TCH230はヒトTCH230のアミノ酸配列を、ISBTは回腸ナトリウム依存性胆汁酸トランスポータ（ISBT）のアミノ酸配列を、\*は遺伝子多型（SNPs）に由来するアミノ酸置換（Ile→Val）の生じる位置を示す。□は、ヒトTCH230とISBTの一致するアミノ酸を示す。

図２は、ヒトTCH230遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量はcDNA溶液1μl当たりのコピー数で表した。

図３は、ヒトTCH230遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量はcDNA溶液1μl当たりのコピー数で表した。

図４は、ヒトTCH230遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量はcDNA溶液1μl当たりのコピー数で表した。

図５は、ヒトTCH230遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量はcDNA溶液1μl当たりのコピー数で表した。

図６は、ヒトTCH234、ラットNHE4およびヒトNHE2のアミノ酸配列の比較を表す図である。図中、TCH234はヒトTCH234のアミノ酸配列を、ratNHE4はラットNHE4のアミノ酸配列を、humanNHE2はヒトNHE2のアミノ酸配列を、Aはアミロライド結合部位を、TM1～TM13は膜貫通領域を示す。□は、ヒトTCH234に一致するアミノ酸を示す。

図７は、ヒトTCH234遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発

現量はcDNA溶液1 $\mu$ l当たりのコピー数で表した。

図8は、ヒトTCH212、ATP8A1およびmATP8A2のアミノ酸配列の比較を表す図である。図中、TCH212はヒトTCH212のアミノ酸配列を、ATP8A1はP型ATPase 8A1のアミノ酸配列を、mATP8A2はマウスP型ATPase 8A2のアミノ酸配列を示す。□は、ヒトTCH212に一致するアミノ酸を示す。TM1~10は、膜貫通領域を示す。(図9へつづく)

図9は、ヒトTCH212、ATP8A1およびmATP8A2のアミノ酸配列の比較を表す図である。図中、TCH212はヒトTCH212のアミノ酸配列を、ATP8A1はP型ATPase 8A1のアミノ酸配列を、mATP8A2はマウスP型ATPase 8A2のアミノ酸配列を示す。□は、ヒトTCH212に一致するアミノ酸を示す。TM1~10は、膜貫通領域を示す。(図8のつづき。図10へつづく。)

図10は、ヒトTCH212、ATP8A1およびmATP8A2のアミノ酸配列の比較を表す図である。図中、TCH212はヒトTCH212のアミノ酸配列を、ATP8A1はP型ATPase 8A1のアミノ酸配列を、mATP8A2はマウスP型ATPase 8A2のアミノ酸配列を示す。□は、ヒトTCH212に一致するアミノ酸を示す。TM1~10は、膜貫通領域を示す。(図9のつづき)

図11は、ヒトTCH212遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量はcDNA溶液1 $\mu$ l当たりのコピー数で表した。

図12は、ヒトTCH212遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量はcDNA溶液1 $\mu$ l当たりのコピー数で表した。

図13は、ヒトTCH200、HumanVR1のアミノ酸配列の比較を表す図である。図中、TCH200はヒトTCH200のアミノ酸配列を、hVR1はHumanVR1のアミノ酸配列を示す。TM1~6は、膜貫通領域を示す。A1~3h、Ankyrin繰り返し配列を示す。□は、両配列に一致するアミノ酸を示す。

図14は、ヒトTCH200遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量はcDNA溶液1 $\mu$ l当たりのコピー数で表した。

図15は、マウスTCH230(配列番号:112)およびヒトTCH230(配列番号:1)のアミノ酸配列の比較を表す図である。図中、hTCH230はヒトTCH230のアミノ酸配列を、mTCH230はマウスTCH230のアミノ酸配列を示す。□は、2配列で一

致するアミノ酸を示す。

図 1 6 は、マウスTCH230遺伝子産物の各組織cDNAにおける発現量を表す図である。発現量はcDNA溶液1  $\mu$  l当たりのコピー数で表した。

図 1 7 は、マウスTCH230遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量は、cDNA溶液1  $\mu$  l当たりのマウスTCH230のコピー数を、等量の各組織cDNAにおけるrodent GAPDHのコピー数で割った値で表した。

図 1 8 は、ラットTCH230遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量は、cDNA溶液1  $\mu$  l当たりのラットTCH230のコピー数を、等量の各組織cDNAにおけるrodent GAPDHのコピー数で割った値で表した。

図 1 9 は、ヒトTCH230発現CHO細胞株における[6, 7- $^3$ H(N)]-Estrone sulfateの取り込みを測定した結果を表す図である。取り込み量は、[6, 7- $^3$ H(N)]-Estrone sulfateを1時間取り込ませた際のカウント(cpm)で表した。独立した3wellのカウントの平均値および標準偏差により示した。図中、ベクターpcDNA3.1(+)を導入した細胞をMock、ヒトTCH230発現CHO細胞をTCH230で表し、NaClバッファーで[6, 7- $^3$ H(N)]-Estrone sulfateを取り込ませたものをそれぞれ、Mock/NaCl、TCH230/NaClで、NMDGバッファーで[6, 7- $^3$ H(N)]-Estrone sulfateを取り込ませたものをそれぞれ、Mock/NMDG、TCH230/NMDGで表した。

図 2 0 は、ヒトTCH230発現CHO細胞株における[1, 2, 6, 7- $^3$ H(N)]-DHEA-Sの取り込みを測定した結果表す図である。取り込み量は、[1, 2, 6, 7- $^3$ H(N)]-DHEA-Sを1時間取り込ませた際のカウント(cpm)で表した。独立した3wellのカウントの平均値および標準偏差により示した。図中、ベクターpcDNA3.1(+)を導入した細胞をMock、ヒトTCH230発現CHO細胞をTCH230で表し、NaClバッファーで[1, 2, 6, 7- $^3$ H(N)]-DHEA-Sを取り込ませたものをそれぞれ、Mock/NaCl、TCH230/NaClで、NMDGバッファーで[1, 2, 6, 7- $^3$ H(N)]-DHEA-Sを取り込ませたものをそれぞれ、Mock/NMDG、TCH230/NMDGで表した。

図 2 1 は、マウスTCH234遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量は、cDNA溶液1  $\mu$  l当たりのマウスTCH234のコピー数を、等量の各組織cDNAにおけるrodent GAPDHのコピー数で割った値で表した。

図 2 2 は、ラットTCH234遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。

図中、縦軸は発現量を示し、cDNA溶液1  $\mu$  l 当たりのラットTCH234のコピー数を、等量の各組織cDNAにおけるrodent GAPDHのコピー数で割り、10万倍した値で表した。

図23は、ヒトTCH234遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。

- 5 図中、縦軸は発現量を示し、TCH234のcDNA溶液1  $\mu$  l 当たりのコピー数を、等量の各組織cDNAにおけるGAPDHのコピー数で割り、10万倍した値で表した。

図24は、マウスTCH212遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量は、cDNA溶液1  $\mu$  l 当たりのマウスTCH212のコピー数を、等量の各組織cDNAにおけるrodent GAPDHのコピー数で割った値で表した。

- 10 図25は、ラットTCH212遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量は、cDNA溶液1  $\mu$  l 当たりのラットTCH212のコピー数を、等量の各組織cDNAにおけるrodent GAPDHのコピー数で割った値で表した。

図26は、マウスTCH200遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量は、cDNA溶液1  $\mu$  l 当たりのマウスTCH200のコピー数を、等量の各組織cDNAにおけるrodent GAPDHのコピー数で割り、10万倍した値で表した。

15

図27は、ヒトTCH230遺伝子産物の正常細胞における発現量を表す図である。発現量は、相対的発現量を1万倍した値で表した。

図28は、ヒトTCH234遺伝子産物の正常細胞における発現量を表す図である。発現量は、相対的発現量を1万倍した値で表した。

20

図29は、ヒトTCH200遺伝子産物の正常細胞における発現量を表す図である。発現量は、相対的発現量を1万倍した値で表した。

図30は、マウスTCH234遺伝子産物のCOPDモデルマウス肺における発現量を表す図である。発現量は、相対的発現量を1億倍した値で表した。結果は各群における平均値と標準誤差を示す。

25

図31は、マウスTCH212遺伝子産物のCOPDモデルマウス肺における発現量を表す図である。発現量は、相対的発現量を1億倍した値で表した。結果は各群における平均値と標準誤差を示す。

図32は、マウスTCH230遺伝子産物の大腸炎モデルマウスの大腸における発現量を表す図である。発現量は、相対的発現量を1千万倍した値で表した。結果



は、TaqMan PCR測定を独立に2回行い平均した値を示す。

図 3 3 は、ヒトTCH212遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。  
発現量はcDNA溶液1  $\mu$  l当たりのコピー数で表した。

5 発明を実施するための最良の形態

配列番号：1、配列番号：14、配列番号：104、配列番号：18、配列番号：42または配列番号：66で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、本発明のタンパク質と称することもある）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、脾臓B細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巢、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：1で表されるアミノ酸配

列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

5 配列番号：14で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

10 配列番号：14で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：14で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：14で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

15 配列番号：104で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：104で表わされるアミノ酸配列と約75%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

20 配列番号：104で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：104で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：104で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、基質の輸送などが挙げられる。

基質としては、例えば、ステロイドホルモン、胆汁酸などが挙げられる。

25 ステロイドホルモンとしては、例えば、卵胞ホルモン、黄体ホルモン、男性ホルモン、ミネラルコルチコイド、グルココルチコイド、ステロイド系薬剤またはこれらの代謝物（例、硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体など）などが挙げられる。

卵胞ホルモンとしては、例えば、エストロン、エストラジオール、エストリオール、エステトロールなどが挙げられる。

黄体ホルモンとしては、例えば、プロゲステロン、プレグナジオールなどが挙げられる。

男性ホルモンとしては、例えば、デヒドロエピアンドロステロン、テストステロン、アンドロステンジオン、5 $\alpha$ -ジヒドロテストステロン、アンドロステロンなどが挙げられる。

ミネラルコルチコイドとしては、例えば、アルドステロンなどが挙げられる。

グルココルチコイドとしては、例えば、コルチゾール、コルチゾン、コルチコステロン、デヒドロコルチコステロンなどが挙げられる。

ステロイド系薬剤としては、例えば、デキサメタゾン、ベタメタゾン、プレドニゾロン、トリアムシノロン、フルオロコルチゾン、クロミフェン、タモキシフェン、ダナゾールなどが挙げられる。

胆汁酸としては、例えば、タウロコール酸、グリココール酸、コール酸、リトコール酸、デオキシコール酸、タウロデオキシコール酸、タウロウルソデオキシコール酸、ケノデオキシコール酸、グリコケソデオキシコール酸、グリコデオキシコール酸などが挙げられる。

実質的に同質とは、それらの性質が性質的に（例、生理学的にまたは薬理的に）同質であることを示す。したがって、上記基質の輸送が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.1～10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

上記基質の輸送などの活性の測定は、公知の方法に準じて行うことができ、例えば、Am. J. Physiol.、274巻、G157-169頁、1998年に記載の方法またはそれに準じる方法に従って測定することができる。

配列番号：18で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列と約90%以上、好ましくは約95%以上、好ましくは約97%以上、好ましくは約99%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：18で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含

有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：18で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：18で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

- 5 実質的に同質の活性としては、例えば、カチオン（好ましくは一価のカチオン、例えば $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ など）と $\text{H}^+$ の交換輸送活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に（例、生理学的にまたは薬理学的に）同質であることを示す。したがって、カチオン（好ましくは一価のカチオン、例えば $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ など）と $\text{H}^+$ の交換輸送活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.1～10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。
- 10

- カチオン（好ましくは一価のカチオン、例えば $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ など）と $\text{H}^+$ の交換輸送などの活性の測定は、公知の方法に準じて行うことができ、例えば、J. Biol. Chem., 274巻, 3978-3987頁, 1998年に記載の方法またはそれに準じる方法に従って測定することができる。
- 15

- 配列番号：42で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：42で表わされるアミノ酸配列と96%以上、好ましくは約97%以上、好ましくは約98%以上、好ましくは約99%以上を有するアミノ酸配列などが挙げられる。
- 20

- 配列番号：42で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：42で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：42で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。
- 25

実質的に同質の活性としては、例えば、アミノリン脂質の輸送などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に（例、生理学的にまたは薬理学的に）同質であることを示す。したがって、アミノリン脂質の輸送が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.1～10倍、より好ましくは

0.5～2倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

アミノリン脂質の輸送などの活性の測定は、公知の方法に準じて行うことができ、例えば、J. Biol. Chem.、275巻、23378-23386頁、1998年に記載の方法  
5 またはそれに準じる方法に従って測定することができる。

配列番号：66で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：66で表わされるアミノ酸配列と約45%以上、好ましくは約50%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列など  
10 が挙げられる。

配列番号：66で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：66で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：66で表されるア  
15 ミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、カチオン(例、 $\text{Ca}^{2+}$ など)チャネル活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に(例、生理学的にまたは薬理学的に)同質であることを示す。したがって、カチオンチャ  
20 ネル活性が同等(例、約0.01～100倍、好ましくは約0.1～10倍、より好ましくは0.5～2倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

カチオンチャネル活性などの活性の測定は、公知の方法に準じて行うことができ、例えばネイチャー(Nature)、389巻、816頁、1997年などに記載の方法  
25 またはそれに準じる方法に従って測定することができる。

また、本発明のタンパク質としては、例えば、(1)(i)配列番号：1、配列番号：14または配列番号：104で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは

1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：1、配列番号：14または配列番号：104で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、

(iii) 配列番号：1、配列番号：14または配列番号：104で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号：1、配列番号：14または配列番号：104で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテイン、(2) (i) 配列番号：

18で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは1～90個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：18で表されるアミノ酸配列に1または2個以上

（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号：18で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が

挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号：18で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテイン、(3)

(i) 配列番号：42で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：42で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、

(iii) 配列番号：42で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号：42で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上

（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテイン、(4) (i) 配列番号：66で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：66で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは

は1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、

(iii) 配列番号：66で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、

5 好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸

配列、(iv) 配列番号：66で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上

（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好まし

10 くは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインなども含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置は、とくに限定されない。

15 本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明のタンパク質は、C末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）、アミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）のいずれであってもよい。

20 ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチルなどのC<sub>1-6</sub>アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC<sub>3-8</sub>シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどのC<sub>6-12</sub>アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C<sub>1-2</sub>アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル-C<sub>1-2</sub>アルキル基などのC<sub>7-14</sub>アラルキル基、ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

25 本発明のタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。



さらに、本発明のタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $C_{1-6}$ アルカノイルなどの $C_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内の

5 アミノ酸の側鎖上の置換基（例、 $-OH$ 、 $-SH$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例、ホルミル基、アセチル基などの $C_{1-6}$ アルカノイル基などの $C_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

- 10 本発明のタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：14で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：104で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：18で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：42で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：66
- 15 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などがあげられる。

本発明のタンパク質の部分ペプチドとしては、本発明のタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、本発明のタンパク質と同様の性質を有するものであればいずれのものでもよい。

- 例えば、本発明のタンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも5個以上、
- 20 好ましくは10個以上、好ましくは20個以上、好ましくは50個以上、さらに好ましくは70個以上、より好ましくは100個以上、最も好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

- また、本発明の部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上
- （例えば1～20個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数
- 25 （1～5）個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～20個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～20個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中

の1または2個以上（例えば1～20個程度、好ましくは1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

本発明の部分ペプチドとしては、例えば、配列番号：1または配列番号：14で表されるアミノ酸配列において例えば第1～28番目、第99～129番目、第180～193番目、第246～286番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：18で表されるアミノ酸配列において例えば第40番目～60番目、第330番目～350番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：42で表されるアミノ酸配列において例えば第301～322番目、第941～952番目、第1012～1028番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：66で表されるアミノ酸配列において例えば第460番目～第485番目、第610番目～第630番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：104で表されるアミノ酸配列において例えば第1～28番目、第99～129番目、第180～193番目、第245～285番目のアミノ酸配列を有するペプチドなどがあげられる。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）であるが、前記本発明のタンパク質のごとく、C末端がアミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）であってもよい。

さらに、本発明の部分ペプチドには、前記本発明のタンパク質と同様に、C末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有しているもの、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明の部分ペプチドは抗体作成のための抗原としても用いることができる。たとえば、後述する本発明の抗体を調製する目的には、例えば、配列番号：1または配列番号：14で表されるアミノ酸配列において第1～28番目、第99～129番目、第180～193番目、第246～286番目のアミノ酸配

- 列を有するペプチド、配列番号：18で表されるアミノ酸配列において例えば、第40番目～60番目、第330番目～350番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：42で表されるアミノ酸配列において例えば、第301～322番目、第941～952番目、第1012～1028番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：66で表されるアミノ酸配列において例えば第460番目～第485番目、第610番目～第630番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：104で表されるアミノ酸配列において例えば第1～28番目、第99～129番目、第180～193番目、第245～285番目のアミノ酸配列を有するペプチドなどがあげられる。
- 10 本発明のタンパク質または部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、
- 15 コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、タンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

20

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせてることにより精製単離することができる。

25

本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ペ

ンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、  
5 4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂  
などを挙げるができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質または部分ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶  
10 液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エ  
15 チル-N'- (3-ジメチルアミノプロリル) カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

20 保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフラン  
25 などのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃~50℃の範囲から適宜選択さ

れる。活性化されたアミノ酸誘導体は通常 1.5 ～ 4 倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸または

5 アセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフル

10 オロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘ

15 プチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベン

20 ジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（C<sub>1-6</sub>）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオ

25 キシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメ

チル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなりガンド作動性カチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

タンパク質または部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該

ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分ペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質または部分ペプチドとを製造し、これらのタンパク質またはペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。

5 縮合により得られた保護タンパク質またはペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。この粗タンパク質またはペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質またはペプチドのアミド体を得ることができる。

10 タンパク質またはペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質またはペプチドのアミド体と同様にして、所望のタンパク質またはペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明の部分ペプチドまたはそれらの塩は、公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の(a)～

15 (e)に記載された方法が挙げられる。

(a) M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

(b) SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

25

(c) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

(d) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学 I V、205、(1977年)

(e) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明のタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。好ましくはDNAである。DNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、例えば（１）配列番号：２もしくは配列番号：１１で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：２もしくは配列番号：１１で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：１で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、（２）配列番号：１３もしくは配列番号：１２で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：１３もしくは配列番号：１２で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：１４で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、（３）配列番号：１０５もしくは配列番号：１１２で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：１０５もしくは配列番号：１１２で表される塩基配列とハイスト



リンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：104で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(4) 配列番号：19もしくは配列番号：41で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：19もしくは配列番号：41で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：18で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(5) 配列番号：43、配列番号：60、配列番号：61もしくは配列番号：62で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：43、配列番号：60、配列番号：61もしくは配列番号：62で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：42で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(6) 配列番号：67もしくは配列番号：103で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：67もしくは配列番号：103で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：66で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：2もしくは配列番号：11で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2もしくは配列番号：11で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：13もしくは配列番号：12で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：13もしくは配列番号：12で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：１０５もしくは配列番号：１１２で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：１０５もしくは配列番号：１１２で表される塩基配列と約７５％以上、好ましくは約８０％以上、好ましくは約９０％以上、好ましくは約９５％以上の  
5 同源性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：１９もしくは配列番号：４１で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：１９もしくは配列番号：４１で表される塩基配列と約９０％以上、好ましくは約９５％以上、好ましくは約９７％以上、好ましくは約９９％以上の同  
10 性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：４３、配列番号：６０、配列番号：６１もしくは配列番号：６２で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：４３、配列番号：６０、配列番号：６１もしくは配列番号：６２で表される塩基配列と９６％以上、好ましくは約  
15 ９７％以上、好ましくは約９８％以上、好ましくは約９９％以上の同源性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：６７もしくは配列番号：１０３で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：６７もしくは配列番号：１０３で表される塩基配列と約４５％以上、好ましくは約  
20 ５０％以上、好ましくは約７０％以上、好ましくは約８０％以上、好ましくは約９０％以上、好ましくは約９５％以上の同源性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al.,  
25 Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約１９～４０

mM、好ましくは約19～20mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：2もしくは配列番号：11で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：14で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：13もしくは配列番号：12で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：104で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：105もしくは配列番号：112で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：18で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：19もしくは配列番号：41で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：42で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：43、配列番号：60、配列番号：61もしくは配列番号：62で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：66で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：67もしくは配列番号：103で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。好ましくはDNAである。DNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：19、配列番号：41、配列番号：43、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：67、配列番号：103、配列番号：105もしくは配列番号：112で表される塩基配列を有するDNAの一部分を有するDNA、または配列番号：2、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：

号：19、配列番号：41、配列番号：43、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：67、配列番号：103、配列番号：105もしくは配列番号：112で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部分を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：2、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：19、配列番号：41、配列番号：43、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：67、配列番号：103、配列番号：105もしくは配列番号：112で表される塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

本発明のタンパク質、部分ペプチド（以下、これらをコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質をコードする塩基配列の一部分を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したもののハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express Km（宝酒造（株））、Mutan<sup>TM</sup>-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR法やGapped duplex法やKunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、（イ）本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、（ロ）該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110、pTP5、pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19、pSH15）、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、パキユロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNAI/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ PLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーター

などが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシング  
シグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、  
SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いること  
5 ができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、d  
hfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、  
アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイシ  
ン耐性遺伝子（以下、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性）等が挙げ  
られる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdh  
10 fr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含ま  
ない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質の  
N端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグ  
ナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、  
15  $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が  
酵母である場合は、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿  
主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフ  
ェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有す  
20 るベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、  
昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ  
(*Escherichia coli*) K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル  
25 ル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc.  
Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103〔ヌクイ  
レック・アシズ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(19  
81)], JA221〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー  
(Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB

101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

5     バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (Bacillus subtilis) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

10     酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンペ (Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (Pichia pastoris) KM71 などが用いられる。

15     昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh Five<sup>TM</sup>細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N細胞; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

20     昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

25     動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr<sup>-</sup>) 細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエ

ー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene) , 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

5     パチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics) , 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

10     酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology) , 194巻, 182-187(1991)、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

15     昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology) , 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

20     動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール. 263-267(1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology) , 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

25     このようにして、タンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

30     宿主がエシェリヒア属菌、パチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。



エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller) , ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics) , 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、 $3\beta$ -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

10 宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

15 宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

20 宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー

(Nature) , 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

25 宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science) , 122巻,

501(1952)), DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン

(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)) などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

10 以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

15 本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトンX-100™などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタン

20 パク質が分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用

25

する方法などが用いられる。

かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロッティングなどにより測定することができる。

本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、抗体の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

#### 〔モノクローナル抗体の作製〕

##### （a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよ

びラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髓腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1～20:1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行な

うことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

#### （b）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

#### 〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアタンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ

血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン 1 に対し、約 0.1 ～ 20、好ましくは約 1 ～ 5 の割合でカプルさせる方法が  
用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いること  
5 ができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、  
チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるい  
は担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、  
完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよ  
10 い。投与は、通常約 2 ～ 6 週毎に 1 回ずつ、計約 3 ～ 10 回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、  
好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定  
と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクロ  
15 ーナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうこ  
とができる。

本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードする DNA（以下、アンチ  
センスポリヌクレオチドの説明においては、これらの DNA を本発明の DNA  
20 と略記する場合がある）の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基  
配列またはその一部を有するアンチセンスポリヌクレオチドとしては、本発明  
の DNA の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその  
一部を有し、該 DNA の発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれ  
のアンチセンスポリヌクレオチドであってもよいが、アンチセンス DNA が好  
25 ましい。

本発明の DNA に実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明の DNA  
に相補的な塩基配列（すなわち、本発明の DNA の相補鎖）の全塩基配列ある  
いは部分塩基配列と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは  
約 90% 以上、最も好ましくは約 95% 以上の相同性を有する塩基配列などが

挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドが好適である。

具体的には、配列番号：2、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：19、配列番号：41、配列番号：43、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：67、配列番号：103、配列番号：105もしくは配列番号：112で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド、好ましくは例えば、配列番号：2、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：19、配列番号：41、配列番号：43、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：67、配列番号：103、配列番号：105もしくは配列番号：112で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチドなどが挙げられる。

アンチセンスポリヌクレオチドは通常、10～40個程度、好ましくは15～30個程度の塩基から構成される。

ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスDNAを構成する各ヌクレオチドのりん酸残基（ホスフェート）は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾りん酸残基に置換されていてもよい。これらのアンチセンスポリヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

本発明に従えば、本発明のタンパク質遺伝子の複製または発現を阻害することのできる該遺伝子に対応するアンチセンスポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは決定されたタンパク質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。かかるアンチセンスポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいは本発明のタンパク質

関連RNAとの相互作用を介して本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明のタンパク質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明のタンパク質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外で本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とタンパク質との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される（指令にある）タンパク質のアミノ酸を通常指している。タンパク質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パンドローム領域または3'端ヘアピンループなどは、好ましい対象領域として選択しうるが、タンパク質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係については、目的核酸が対象領域とハイブリダイズすることができる場合は、その目的核酸は、当該対象領域のポリヌクレオチドに対して「アンチセンス」とであるということができる。アンチセンスポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペ어링や塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、DNA:RNAハイブリッドであってもよく、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のある



もの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（例、ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーL-リジンなど）や糖（例、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 $\alpha$ アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。このような修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、またはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、RNA、DNAまたは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては、核酸の硫黄誘導体、チオホスフェート誘導体、ポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものなどが挙げられる。本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、例えば、以下のように設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンスポリヌクレオチドをより安定なものにする、アンチセンスポリヌクレオチドの細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、また、もし毒性があるような場合はアンチセンスポリヌクレオチドの毒性をより小さなものにする。このような修飾は、例えばPharm Tech Japan, 8巻, 247頁または395頁, 1992年、Antisense Research

and Applications, CRC Press, 1993年などで数多く報告されている。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リボソーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例、ホスホリピド、コレステロールなど）などの疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端または5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端または5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンスポリヌクレオチドの阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、または本発明のタンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。

以下に、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）、本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、および本発明のDNAのアンチセンスポリヌクレオチド（以下、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドと略記する場合がある）の用途を説明する。

また、配列番号：1、配列番号：14または配列番号：104で表されるア

ミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質を「本発明のタンパク質A」、配列番号：18と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質を「本発明のタンパク質B」、配列番号：42で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質を「本発明のタンパク質C」、配列番号：66で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質を「本発明のタンパク質D」と略称することもある。

〔1〕本発明のタンパク質が関与する各種疾病の予防・治療剤

本発明のタンパク質Aは、基質の輸送に寄与するとともに、その基質代謝などに重要な役割を果たしている。以下、本発明のタンパク質Aの基質を「基質A」と略記することもある。

基質Aとしては、例えば、ステロイドホルモン、胆汁酸などが挙げられる。

ステロイドホルモンとしては、例えば、卵胞ホルモン、黄体ホルモン、男性ホルモン、ミネラルコルチコイド、グルココルチコイド、ステロイド系薬剤またはこれらの代謝物（例、硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体など）などが挙げられる。中でも、好ましくは、ステロイドホルモンまたはその代謝物である。さらに好ましくは卵胞ホルモンもしくは男性ホルモンまたはその代謝物（好ましくは、硫酸抱合体など）などである。最も好ましくは、エストロン、デヒドロエピアンドロステロンまたはこれらの硫酸抱合体である。

卵胞ホルモンとしては、例えば、エストロン、エストラジオール、エストリオール、エステトロールなどが挙げられる。

黄体ホルモンとしては、例えば、プロゲステロン、プレグナジオールなどが挙げられる。

男性ホルモンとしては、例えば、デヒドロエピアンドロステロン、テストステロン、アンドロステンジオン、 $5\alpha$ -ジヒドロテストステロン、アンドロステロンなどが挙げられる。

ミネラルコルチコイドとしては、例えば、アルドステロンなどが挙げられる。

グルココルチコイドとしては、例えば、コルチゾール、コルチゾン、コルチ

コステロン、デヒドロコルチコステロンなどが挙げられる。

ステロイド系薬剤としては、例えば、デキサメタゾン、ベタメタゾン、プレドニゾン、トリアムシノロン、フルオロコルチゾン、クロミフェン、タモキシフェン、ダナゾールなどが挙げられる。

- 5 胆汁酸としては、例えば、タウロコール酸、グリココール酸、コール酸、リトコール酸、デオキシコール酸、タウロデオキシコール酸、タウロウルソデオキシコール酸、ケノデオキシコール酸、グリコケノデオキシコール酸、グリコデオキシコール酸などが挙げられる。

- したがって、本発明のタンパク質AをコードするDNAに異常があったり、  
10 欠損している場合あるいは本発明のタンパク質Aの発現量が減少している場合には、例えば、高脂血症、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、  
15 全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、糖  
20 尿病、甲状腺機能低下、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、膵臓疾患（例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）などの種々の疾患が発症する。

- 25 したがって、本発明のタンパク質AおよびそれをコードするDNAは、例えば、高脂血症、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息など）、自己免疫疾患（例、

重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリ  
テマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、ア  
ナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢  
性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球  
5 異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、糖尿病、甲状腺  
機能低下、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭  
心症など）、膵臓疾患（例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など）、  
癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞  
10 肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺  
腫、筋肉腫など）などの予防・治療剤などの安全な医薬として使用することが  
できる。好ましくは高脂血症、動脈硬化、生殖器疾患、消化器疾患などの予  
防・治療剤である。

例えば、生体内において本発明のタンパク質Aが減少あるいは欠損している  
ために、基質Aの輸送活性が十分に、あるいは正常に発揮されない患者がいる  
15 場合に、(i) 本発明のタンパク質AをコードするDNAを該患者に投与し、生  
体内で本発明のタンパク質Aを発現させることによって、(ii) 細胞に上記D  
NAを挿入し、本発明のタンパク質Aを発現させた後に、該細胞を患者に移植  
することによって、または(iii) 本発明のタンパク質Aを該患者に投与するこ  
となどによって、該患者における本発明のタンパク質の役割を十分に、あるい  
20 は正常に発揮させることができる。

本発明のタンパク質Bは、カチオン（好ましくは一価のカチオン、例えば $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ など）と $\text{H}^+$ の交換輸送活性などを有し、細胞内のpHの調節、細胞容積調節、腎  
臓や小腸における $\text{Na}^+$ の再吸収などの重要な役割を果たしている。

したがって、本発明のタンパク質BをコードするDNAに異常があったり、  
25 欠損している場合あるいは本発明のタンパク質Bの発現量が減少している場合  
には、例えば、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、消化器疾患（例、過敏性  
腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直  
腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、  
喘息など）、膵臓疾患（例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など）、

自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巢嚢腫など）、脾臓疾患、癌（例、精巣腫瘍、卵巢癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）などの予防・治療剤などの安全な医薬として使用することができる。好ましくは、呼吸器疾患、腎疾患、消化器疾患などの種々の疾患が発症する。

したがって、本発明のタンパク質BおよびそれをコードするDNAは、例えば、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巢嚢腫など）、脾臓疾患、癌（例、精巣腫瘍、卵巢癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）などの予防・治療剤などの安全な医薬として使用する

ことができる。好ましくは、呼吸器疾患、腎疾患、消化器疾患などの予防・治療剤である。

例えば、生体内において本発明のタンパク質Bが減少あるいは欠損しているために、カチオン（好ましくは一価のカチオン、例えば $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ など）と $\text{H}^+$ の交換輸送活性が十分に、あるいは正常に発揮されない患者がいる場合に、（i）本発明のタンパク質BをコードするDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のタンパク質Bを発現させることによって、（ii）細胞に上記DNAを挿入し、本発明のタンパク質Bを発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または（iii）本発明のタンパク質Bを該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のタンパク質Bの役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

本発明のタンパク質Cは、アミノリン脂質の輸送活性などを有し、アミノリン脂質の輸送に寄与するとともに、生体膜の脂質分布などに重要な役割を果たしている。

したがって、本発明のタンパク質CをコードするDNAに異常があったり、欠損している場合あるいは本発明のタンパク質Cの発現量が減少している場合には、例えば、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、糖尿病、高脂血症、胆汁うっ滞、または癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、脾臓疾患、中枢神経系疾患、消化器疾患、呼吸器疾患などの種々の疾患が発症する。

したがって、本発明のタンパク質CおよびそれをコードするDNAは、例えば、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、生殖器疾

患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、糖尿病、高脂血症、胆汁うっ滞、または癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）などの予防・治療剤などの安全な医薬として使用することができる。好ましくは、膵臓疾患、中枢神経系疾患、消化器疾患、呼吸器疾患などの予防・治療剤である。

例えば、生体内において本発明のタンパク質Cが減少あるいは欠損しているために、アミノリン脂質の輸送活性が十分に、あるいは正常に発揮されない患者がいる場合に、（i）本発明のタンパク質CをコードするDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のタンパク質Cを発現させることによって、（ii）細胞に上記DNAを挿入し、本発明のタンパク質Cを発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または（iii）本発明のタンパク質Cを該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のタンパク質の役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

本発明のタンパク質Dは、カチオンチャネル活性を有し、痛みなどの刺激の認識に重要な役割を果たしている。温度感受性カチオンチャネルとしても機能しうる。

したがって、本発明のタンパク質DをコードするDNAに異常があったり、欠損している場合あるいは本発明のタンパク質Dの発現量が減少している場合には、例えば、炎症性疾患（例、敗血症、肺炎、脳炎、髄膜炎、肝炎、心筋炎、胸膜炎など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、糖尿病性神経症、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺



異常にともなう免疫不全など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、筋肉疾患（例、筋萎縮症など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巢嚢腫など）、熱傷、疼痛症候群（例、癌性疼痛、関連痛など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巢癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、炎症性疾患、リウマチ性疾患、糖尿病性神経症などの種々の疾患が発症する。

したがって、本発明のタンパク質DおよびそれをコードするDNAは、例えば、炎症性疾患（例、敗血症、肺炎、脳炎、髄膜炎、肝炎、心筋炎、胸膜炎など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、糖尿病性神経症、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、筋肉疾患（例、筋萎縮症など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巢嚢腫など）、熱傷、疼痛症候群（例、癌性疼痛、関連痛など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巢癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）などの予

防・治療剤などの安全な医薬として使用することができる。好ましくは、炎症性疾患、リウマチ性疾患、糖尿病性神経症などの予防・治療剤である。

例えば、生体内において本発明のタンパク質Dが減少あるいは欠損しているために、カチオンチャネル活性が十分に、あるいは正常に発揮されない患者がいる場合に、(i) 本発明のタンパク質DをコードするDNAを該患者に投与し、  
5 生体内で本発明のタンパク質Dを発現させることによって、(ii) 細胞に上記DNAを挿入し、本発明のタンパク質Dを発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または(iii) 本発明のタンパク質Dを該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のタンパク質の役割を十分に、ある  
10 いは正常に発揮させることができる。

本発明のDNAを上記の予防・治療剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のタンパク質を上記の予防・治療剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

本発明のタンパク質は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のタンパク質等を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼ

ラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルピトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、温血動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

本発明のタンパク質Aの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどに

より差異はある。例えば、高脂血症の治療目的で本発明のタンパク質Aを経口投与する場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき該タンパク質を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該タンパク質の1回投与量は投与対象、  
5 対象疾患などによっても異なるが、例えば、高脂血症の治療目的で本発明のタンパク質Aを注射剤の形で成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該タンパク質を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

10 本発明のタンパク質Bの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はある。例えば、腎不全の治療目的で本発明のタンパク質Bを経口投与する場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき該タンパク質を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該タンパク質の1回投与量は投与対象、対象  
15 疾患などによっても異なるが、例えば、腎不全の治療目的で本発明のタンパク質Bを注射剤の形で成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該タンパク質を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

20 本発明のタンパク質Cの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、糖尿病の治療目的で本発明のタンパク質Cを経口投与する場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき該タンパク質を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該タンパク質の1回投与量は投与対象、  
25 対象疾患などによっても異なるが、例えば、糖尿病の治療目的で本発明のタンパク質Cを注射剤の形で成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該タンパク質を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

本発明のタンパク質Dの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、慢性関節リウマチの治療目的で本発明のタンパク質Dを経口投与する場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき該タンパク質を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該タンパク質の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、慢性関節リウマチの治療目的で本発明のタンパク質等を注射剤の形で成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該タンパク質を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

## 〔2〕 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

本発明は、（1）本発明のタンパク質Aを用いることを特徴とする本発明のタンパク質Aの活性（例、基質Aの輸送活性など）を促進または阻害する化合物またはその塩（以下、それぞれ促進剤、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供する。より具体的には、例えば、

（2）（i）本発明のタンパク質Aを産生する能力を有する細胞の基質Aの輸送活性と（ii）本発明のタンパク質Aを産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物の基質Aの輸送活性の比較を行なうことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

具体的には、上記スクリーニング方法においては、例えば、（i）と（ii）の場合において、標識した基質Aの、上記細胞への取り込み量を測定し、比較する。

標識剤としては、例えば、放射性同位元素（例、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{32}\text{P}]$ 、 $[^{33}\text{P}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ など）、蛍光物質（例、シアニン蛍光色素（例、Cy2、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7（アマシャムバイオサイエンス社製）など）、フルオレセインなど）、発光物質（例、ルミノールなど）、酵素（例、ペルオキシダー

ゼなど) またはランタニド元素などが用いられる。

標識した基質Aとしては、例えば、[6, 7-<sup>3</sup>H(N)]-Estrone sulfate、  
[1, 2, 6, 7-<sup>3</sup>H(N)]-Dehydroepiandrosterone Sulfateなどが用いられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、  
5 合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質Aを産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。  
10 バッファーには、pH約4～10（望ましくは、pH約6～8）のリン酸バッファー、ほう酸バッファーなどの、本発明のタンパク質Aの活性を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

本発明のタンパク質Aを産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質AをコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、CHO細胞  
15 などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質Aを細胞膜上に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。

基質Aの輸送活性は、公知の方法、例えば、Am. J. Physiol., 274巻、G157-  
20 169頁、1998年に記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って測定することができる。

例えば、上記(ii)の場合における基質Aの輸送活性を、上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上促進する試験化合物を本発明のタンパク質Aの活性を促進する化合物または  
25 その塩として選択することができる。

また、例えば、上記(ii)の場合における基質Aの輸送活性を、上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害（または抑制）する試験化合物を本発明のタンパク質Aの活性を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

具体例を以下に記載する。

まず、上記細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地または細胞に毒性を示さない適当なバッファに交換したのち、一定量（5000～500000cpm）の標識した基質Aを添加し、  
5 同時に $10^{-10}$ ～ $10^{-7}$ Mの試験化合物を共存させる。反応は0～50℃、好ましくは4～37℃で、20分～24時間、好ましくは30分～3時間行う。反応後、培地またはバッファを除去し、適量のバッファ（例、PBSなど）で洗浄した後、該細胞に取り込まれた標識した基質Aによる放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウントを100%とした時、拮抗する物質がある場合のカウントが例えば50%以下になる試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

また、本発明のタンパク質A遺伝子のプロモーター下流に分泌型アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼなどの遺伝子を挿入し、上記の各種細胞に発現させ、該細胞に上記試験化合物を接触させた場合における酵素活性を賦活化または阻害する化合物またはその塩を探索することによって本発明のタンパク質Aの発現を促進または抑制（すなわち、本発明のタンパク質Aの活性を促進または阻害）する化合物またはその塩をスクリーニングすることができる。

本発明は、（1'）本発明のタンパク質Bを用いることを特徴とする本発明のタンパク質Bの活性〔例えば、カチオン（好ましくは一価のカチオン、例えば $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ など）と $\text{H}^+$ の交換輸送など〕促進または阻害する化合物またはその塩  
20 （以下、それぞれ促進剤、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供する。より具体的には、例えば、

（2'）（i'）本発明のタンパク質Bを産生する能力を有する細胞のカチオン（好ましくは一価のカチオン、例えば $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ など）と $\text{H}^+$ の交換輸送活性と  
25 （ii'）本発明のタンパク質Bを産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物のカチオン（好ましくは一価のカチオン、例えば $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ など）と $\text{H}^+$ の交換輸送活性の比較を行なうことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

具体的には、上記スクリーニング方法においては、例えば、(i') と (ii') の場合において、カチオン（好ましくは一価のカチオン、例えば $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ など）と $\text{H}^+$ の交換輸送活性を蛍光色素で測定し、カチオン（好ましくは一価のカチオン、例えば $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ など）と $\text{H}^+$ の交換輸送活性の指標として比較することを特徴とするものである。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質Bを産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH約4～10（望ましくは、pH約6～8）のリン酸バッファー、ほう酸バッファーなどの、本発明のタンパク質Bのカチオン（好ましくは一価のカチオン、例えば $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ など）と $\text{H}^+$ の交換輸送活性を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

本発明のタンパク質Bを産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、CHO細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質Bを細胞膜上に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。

本発明のタンパク質Bのカチオン（好ましくは一価のカチオン、例えば $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ など）と $\text{H}^+$ の交換輸送活性は、公知の方法、例えば、J. Biol. Chem. 274巻、3978-3987頁、1998年に記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って測定することができる。

例えば、上記(ii') の場合におけるカチオン（好ましくは一価のカチオン、例えば $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ など）と $\text{H}^+$ の交換輸送活性を、上記(i') の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上促進する試験化合物を本発明のタンパク質Bの活性を促進する化合物またはその塩として選



択することができる。

また、例えば、上記 (ii') の場合におけるカチオン（好ましくは一価のカチオン、例えば  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  など）と  $\text{H}^+$  の交換輸送活性を、上記 (i') の場合に比べて、約 20 % 以上、好ましくは 30 % 以上、より好ましくは約 50 % 以上阻害（または抑制）する試験化合物を本発明のタンパク質 B の活性を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

また、本発明のタンパク質 B 遺伝子のプロモーター下流に分泌型アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼなどの遺伝子を挿入し、上記の各種細胞に発現させ、該細胞に上記試験化合物を接触させた場合における酵素活性を賦活化または阻害する化合物またはその塩を探索することによって本発明のタンパク質 B の発現を促進または抑制（すなわち、本発明のタンパク質 B の活性を促進または阻害）する化合物またはその塩をスクリーニングすることができる。

本発明は、(1'') 本発明のタンパク質 C を用いることを特徴とする本発明のタンパク質 C の活性（例えば、アミノリン脂質の輸送など）を促進または阻害する化合物またはその塩（以下、それぞれ促進剤、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供する。より具体的には、例えば、

(2'') (i'') 本発明のタンパク質 C を産生する能力を有する細胞のアミノリン脂質の輸送活性と (ii'') 本発明のタンパク質 C を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物のアミノリン脂質の輸送活性の比較を行なうことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

具体的には、上記スクリーニング方法においては、例えば、(i'') と (ii'') の場合において、アミノリン脂質の輸送を、放射標識した基質または蛍光色素で測定し、アミノリン脂質の輸送を指標として比較することを特徴とするものである。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質Cを産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH約4～10（望ましくは、pH約6～8）のリン酸バッファー、ほう酸バッファーなどの、本発明のタンパク質Cのアミノリン脂質の輸送活性を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

本発明のタンパク質Cを産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質CをコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、CHO細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質Cを細胞膜上に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。

本発明のタンパク質Cのアミノリン脂質の輸送活性は、公知の方法、例えば、J. Biol. Chem.、275巻、23378-23386頁、1998年に記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って測定することができる。

例えば、上記(i'')の場合におけるアミノリン脂質の輸送活性を、上記(i')の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上促進する試験化合物を本発明のタンパク質Cの活性を促進する化合物またはその塩として選択することができる。

また、例えば、上記(ii'')の場合におけるアミノリン脂質の輸送活性を、上記(i')の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害（または抑制）する試験化合物を本発明のタンパク質Cの活性を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

また、本発明のタンパク質C遺伝子のプロモーター下流に分泌型アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼなどの遺伝子を挿入し、上記の各種細胞に発現させ、該細胞に上記試験化合物を接触させた場合における酵素活性を賦活化または阻害する化合物またはその塩を探索することによって本発明のタンパク質Cの発現を促進または抑制（すなわち、本発明のタンパク質Cの活性を促進または阻害）する化合物またはその塩をスクリーニングすることができる。

本発明は、(1''') 本発明のタンパク質Dを用いることを特徴とする本発明のタンパク質の活性（例えば、カチオンチャネル活性など）を促進または阻害する化合物またはその塩（以下、それぞれ促進剤、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供する。より具体的には、例えば、

- 5 (2''') (i''') 本発明のタンパク質Dを産生する能力を有する細胞のカチオンチャネル活性と (ii''') 本発明のタンパク質Dを産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物のカチオンチャネル活性の比較を行なうことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

具体的には、上記スクリーニング方法においては、例えば、(i''') と  
10 (ii''') の場合において、カチオンチャネル活性をパッチ・クランプ法で測定し、カチオンチャネル活性の指標として比較することを特徴とするものである。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であつてもよい。

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質Dを産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH約4～10（望ましくは、pH約6～8）のリン酸バッ  
20 ファー、ほう酸バッファーなどの、本発明のタンパク質Dのカチオンチャネル活性を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、CHO細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質を細胞膜上に発現させた形質  
25 転換体が好ましく用いられる。

本発明のタンパク質Dのカチオンチャネル活性は、公知の方法、例えば、Nature、389巻、816頁、1997年に記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って測定することができる。

例えば、上記 (ii''') の場合におけるカチオンチャネル活性を、上記 (i''') の場合に比べて、約 20 % 以上、好ましくは 30 % 以上、より好ましくは約 50 % 以上促進する試験化合物を本発明のタンパク質 D の活性を促進する化合物またはその塩として選択することができる。

- 5        また、例えば、上記 (ii''') の場合におけるカチオンチャネル活性を、上記 (i''') の場合に比べて、約 20 % 以上、好ましくは 30 % 以上、より好ましくは約 50 % 以上阻害（または抑制）する試験化合物を本発明のタンパク質 D の活性を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

- 10        また、本発明のタンパク質 D 遺伝子のプロモーター下流に分泌型アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼなどの遺伝子を挿入し、上記の各種細胞に発現させ、該細胞に上記試験化合物を接触させた場合における酵素活性を賦活化または阻害する化合物またはその塩を探索することによって本発明のタンパク質 D の発現を促進または抑制（すなわち、本発明のタンパク質 D の活性を促進または阻害）する化合物またはその塩をスクリーニングすることができる。

- 15        本発明のタンパク質 D を用い、または組換え型本発明のタンパク質 D の発現系を用いたりガンド結合アッセイ系を用いることにより、本発明のタンパク質 D と、そのリガンド（以下、本発明のリガンドと略記する）との結合性を変化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることもできる。

- 20        具体的には、(A) 本発明のタンパク質 D に、本発明のリガンドを接触させた場合と (B) 本発明のタンパク質 D に、本発明のリガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なう。比較は、例えば、本発明のタンパク質 D に対する本発明のリガンドの結合量などを測定して行う。

本発明のスクリーニング方法としての具体例としては、例えば、

- 25        (a) 本発明のリガンドを本発明のタンパク質 D に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明のタンパク質 D に接触させた場合における、本発明のリガンドの本発明のタンパク質 D に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明のタンパク質 D との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(b) 本発明のリガンドを、本発明のタンパク質Dを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明のタンパク質Dを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、本発明のリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較  
5 することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明のタンパク質Dとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(c) 本発明のタンパク質Dが、本発明のタンパク質DをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のタンパク質Dである上記 (b) 記載のスクリーニング方法、

10 (d) 本発明のリガンドが、標識したリガンドである上記 (a) ~ (c) のスクリーニング方法などが挙げられる。

本発明のタンパク質Dとしては、ヒトや温血動物の臓器の膜画分などが好適に用いられる。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させた  
15 本発明のタンパク質Dなどが適している。

本発明のタンパク質Dを製造するには、前述の本発明のタンパク質Dの製造方法などが用いられる。

上記スクリーニング方法において、本発明のタンパク質Dを含有する細胞あるいは該細胞膜画分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。

20 本発明のタンパク質Dを含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。

本発明のタンパク質Dを含有する細胞としては、本発明のタンパク質Dを発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、前述の大腸菌、枯草菌、酵母、  
25 昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。製造方法は前述と同様である。

膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレス

などで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などがあげられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500～3000rpm）で短時間（通常、約1～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中

5 には、発現した本発明のタンパク質Dと細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該本発明のタンパク質Dを含有する細胞や膜画分中の本発明のタンパク質Dの量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

10

前記のスクリーニング方法を実施するためには、例えば、本発明のタンパク質D画分と、本発明のリガンド（例、標識した本発明のリガンド）などが用いられる。本発明のタンパク質D画分としては、天然型の本発明のタンパク質D画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型本発明のタンパク質D画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識したリガンドとしては、例えば、放射性同位元素（例、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{32}\text{P}]$ 、 $[^{33}\text{P}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$  など）、蛍光物質（例、シアニン蛍光色素（例、Cy2、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7（アマシャムバイオサイエンス社製）など）、フルオレセインなど）、発光物質（例、ルミノールなど）、酵素（例、ペルオキシダーゼなど）またはランタニド元素などで標識されたりガンドなどを用いることができる。

15

20

具体的には、本発明のリガンドと本発明のタンパク質Dとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングを行うには、本発明のタンパク質Dを含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4～10（望ましくはpH6～8）のリン酸バッファー、トリスー塩酸バッファーなどのリガンドと受容体との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、

25

非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80™（花王ーアトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによる本発明のタンパク質Dの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01～10mlの該タンパク質溶液に、

5 一定量（5000～500000cpm）の標識した本発明のリガンドを添加し、同時に $10^{-10}$ ～ $10^{-7}$ Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識の本発明のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は0～50℃、望ましくは4～37℃で20分～24時間、望ましくは30分～3時間行う。反応後、ガ

10 ラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（ $B_0$ ）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（ $B_0$ -NSB）を100%とした時、特異的結合量（ $B$ -NSB）が例えば50%以下になる試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選

15 択することができる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られうる化合物またはその塩は、本発明のタンパク質Dと本発明のリガンドとの結合を変化させる化合物またはその塩である。

20 本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

本発明は、（3）本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする本発明のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩（以下、それぞれ促進剤、阻害剤と略記する場合がある）の

25 スクリーニング方法を提供し、より具体的には、例えば、

（4）（iii）本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と（iv）本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物を培養した場合との比較を行うことを特徴とする促進剤または阻害剤のスク

リーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法においては、例えば、(iii) と (iv) の場合における、本発明のタンパク質遺伝子の発現量（具体的には、本発明のタンパク質量または前記タンパク質をコードする mRNA 量）を測定して、比較する。

- 5      試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 10      上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH 約 4 ~ 10（望ましくは、pH 約 6 ~ 8）のリン酸バッファー、ほう酸バッファーなどの、本発明のタンパク質の発現を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

- 15      本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードする DNA を含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、CHO 細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質を細胞膜上に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。

- 20      本発明のタンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質を認識する抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記タンパク質を、ウェスタン解析、ELISA 法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

- 25      本発明のタンパク質遺伝子の発現量は、公知の方法、例えば、ノーザンブロットティングや Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)、リアルタイム PCR 解析システム（アプライドバイオシステムズ社製、TaqMan polymerase chain reaction）などの方法あるいはそれに準じる方法にしたがって測定することができる。

例えば、上記 (iv) の場合における本発明のタンパク質遺伝子の発現量を、



上記 (iii) の場合に比べて、約 20 % 以上、好ましくは 30 % 以上、より好ましくは約 50 % 以上促進する試験化合物を本発明のタンパク質遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩として選択することができる。

例えば、上記 (iv) の場合における本発明のタンパク質遺伝子の発現量を、  
5 上記 (iii) の場合に比べて、約 20 % 以上、好ましくは 30 % 以上、より好ましくは約 50 % 以上阻害する試験化合物を本発明のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

さらに、本発明の抗体は、本発明のタンパク質の発現を促進または阻害する  
10 化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

本発明は、(5) 本発明の抗体を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩（以下、それぞれ促進剤、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供し、より具体的には、例えば、

15 (6) (v) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と (vi) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物を培養した場合との比較を行うことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法においては、例えば、本発明の抗体を用いて (v) と  
20 (vi) の場合における、本発明のタンパク質の発現量（具体的には、本発明のタンパク質量）を測定（例、本発明のタンパク質の発現を検出、本発明のタンパク質の発現量を定量等）して、比較する。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。  
25

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH 約 4 ~ 10（望ましくは、pH 約 6 ~ 8）のリン酸バッ

ファー、ほう酸バッファーなどの、本発明のタンパク質の活性を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

5 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、CHO細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質を細胞膜上に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。

10 本発明のタンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質を認識する抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記タンパク質を、ウェスタン解析、ELISA法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

15 例えば、上記（vi）の場合における本発明のタンパク質の発現量を、上記（v）の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上促進する試験化合物を本発明のタンパク質の発現を促進する化合物またはその塩として選択することができる。

20 例えば、上記（vi）の場合における本発明のタンパク質の発現量を、上記（v）の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害する試験化合物を本発明のタンパク質の発現を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

本発明のスクリーニング用キットは、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドを産生する能力を有する細胞、本発明のリガンド、本発明の抗体などを含有するものである。

25 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物またはその塩であり、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物またはその塩、本発明のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩、本発明のタンパク

質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩、本発明のタンパク質Aと本発明のリガンドとの結合性を変化させる化合物またはその塩などである。

該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。

5

本発明のタンパク質Aの活性を促進する化合物またはその塩、本発明のタンパク質A遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩、および本発明のタンパク質Aの発現を促進する化合物またはその塩は、例えば、高脂血症、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器疾患

10

（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、

15

アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、糖尿病、甲状腺機能低下、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、脾臓疾患

20

（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）などの予防・治療剤、好ましくは高脂血症、動脈硬化、生殖器疾患、消化器疾患などの予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。

25

本発明のタンパク質Aの活性を阻害する化合物またはその塩、本発明のタンパク質A遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩、および本発明のタンパク質Aの発現を阻害する化合物またはその塩は、例えば、高脂血症、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性

閉塞性肺疾患、気管支喘息など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、糖尿病、甲状腺機能低下、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）などの予防・治療剤、好ましくは高脂血症、動脈硬化、生殖器疾患、消化器疾患などの予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。

本発明のタンパク質Bの活性を促進する化合物またはその塩、本発明のタンパク質B遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩、および本発明のタンパク質Bの発現を促進する化合物またはその塩は、例えば、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、脾臓疾患、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキ

ンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）などの予防・治療剤、好ましくは、呼吸器疾患、腎疾患、消化器疾患などの予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。

5 本発明のタンパク質Bの活性を阻害する化合物またはその塩、本発明のタンパク質B遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩、および本発明のタンパク質Bの発現を阻害する化合物またはその塩は、例えば、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、脾臓疾患、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、好ましくは、呼吸器疾患、腎疾患、消化器疾患などの予防・治療剤、などの低毒性で安全な医薬として有用である。

25 本発明のタンパク質Cの活性を促進する化合物またはその塩、本発明のタンパク質C遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩、および本発明のタンパク質Cの発現を促進する化合物またはその塩は、例えば、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）

ど)、消化器疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など)、呼吸器疾患(例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、糖尿病、高脂血症、胆汁うっ滞、または癌(例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、筋肉腫など)などの予防・治療剤、好ましくは膵臓疾患、中枢神経系疾患、消化器疾患、呼吸器疾患などの予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。

本発明のタンパク質Cの活性を阻害する化合物またはその塩、本発明のタンパク質C遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩、および本発明のタンパク質Cの発現を阻害する化合物またはその塩は、例えば、膵臓疾患(例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など)、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など)、中枢神経系疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど)、消化器疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など)、呼吸器疾患(例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、糖尿病、高脂血症、胆汁うっ滞、または癌(例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、筋肉腫など)などの予防・治療剤、好ましくは膵臓疾患、中枢神経系疾患、消化器疾患、呼吸器疾患などの予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。

本発明のタンパク質Dの活性を促進する化合物またはその塩、本発明のタンパク質D遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩、および本発明のタンパク質Dの発現を促進する化合物またはその塩は、例えば、炎症性疾患(例、敗血症、肺炎、脳炎、髄膜炎、肝炎、心筋炎、胸膜炎など)、自己免疫疾患(例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど)、アレルギー性疾患(例、花粉症、アレルギー性鼻炎、ア

- ナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、糖尿病性神経症、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、筋肉疾患（例、筋萎縮症など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、熱傷、疼痛症候群（例、癌性疼痛、関連痛など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）などの予防・治療剤、好ましくは、炎症性疾患、リウマチ性疾患、糖尿病性神経症などの予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。

- 本発明のタンパク質Dの活性を阻害する化合物またはその塩、本発明のタンパク質D遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩、および本発明のタンパク質Dの発現を阻害する化合物またはその塩は、例えば、炎症性疾患（例、敗血症、肺炎、脳炎、髄膜炎、肝炎、心筋炎、胸膜炎など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、糖尿病性神経症、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、筋肉疾患（例、筋萎縮症など）、脾臓疾患（例、

5 5 膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、熱傷、疼痛症候群（例、癌性疼痛、関連痛など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）などの予防・治療剤、好ましくは、炎症性疾患、リウマチ性疾患、糖尿病性神経症などの予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。

10 本発明のタンパク質Dと本発明のリガンドとの結合性を変化させる化合物またはその塩は、例えば、炎症性疾患（例、敗血症、肺炎、脳炎、髄膜炎、肝炎、心筋炎、胸膜炎など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、糖尿病性神経症、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、膵機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、  
15 筋肉疾患（例、筋萎縮症など）、膵臓疾患（例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、熱傷、疼痛症候群（例、癌性疼痛、関連痛など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）などの予防・治療剤、好ましくは炎症性疾患、リウマチ性疾患、糖尿病性神経症などの予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。  
20  
25

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の予防・治療剤として使用する場合、常套手段に



従って製剤化することができる。例えば、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

上記化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、高脂血症治療の目的で本発明のタンパク質Aの活性または発現を促進する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物またはその塩を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、高脂血症治療の目的で上記化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約0.01～30mg、好ましくは0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

上記化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、腎不全治療の目的で本発明のタンパク質Bの活性または発現を促進する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物またはその塩を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、腎不全治療の目的で上記化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約0.01～30mg、好ましくは0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

上記化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与

ルートなどにより差異はあるが、例えば、糖尿病治療の目的で本発明のタンパク質Cの活性または発現を促進する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物またはその塩を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、糖尿病治療の目的で上記化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約0.01～30mg、好ましくは0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

上記化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、慢性関節リウマチ治療の目的で本発明のタンパク質Dの活性または発現を促進する化合物またはその塩、または本発明のタンパク質Dと本発明のリガンドとの結合性を変化させる化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物またはその塩を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、上記化合物またはその塩の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、慢性関節リウマチ治療の目的で上記化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

### 〔3〕本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の定量

本発明の抗体は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法、および

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法を提供する。

上記(ii)の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質のC端部に反応する抗体であることが望ましい。

また、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、または $Fab$ 画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体－抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素（例、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ など）、蛍光物質〔例、シアニン蛍光色素（例、Cy2、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7（アマシャムバイオサイエンス社製）など）、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなど〕、酵素（例、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリホスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素など）、発光物質（例、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなど）、ピオチン、ラン

タニド元素などが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質の測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質のＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原（Ｆ）と、抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ、Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、Ｂ／Ｆ分離をポリエチレ

ングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

5 イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

10 また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

15 これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常条件、操作法に当業者の通常技術的配慮を加えて本発明のタンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

20 例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」 Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 25 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照するこ

とができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質を感度良く定量することができる。

本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質Aの濃度を定量することによって、

5 本発明のタンパク質Aの濃度の減少が検出された場合、例えば、高脂血症、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシー

10 ショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、糖尿病、甲状腺機能低下、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、高脂血症、動脈硬化、生殖器疾患、消化器疾患などが発症し

15 ている可能性が高いと診断することができる。反対に、例えば、本発明のタンパク質Aの濃度の上昇が検出された場合、例えば、高脂血症、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常

20

25

にともなう免疫不全など）、糖尿病、甲状腺機能低下、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、  
5 高脂血症、動脈硬化、生殖器疾患、消化器疾患などが発症している可能性が高いと診断することが出来る。

本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質Bの濃度を定量することによって、本発明のタンパク質Bの濃度の減少が検出された場合、例えば、腎疾患（例、  
10 腎不全、尿毒症など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトー  
15 デスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、脾臓疾患、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、  
20 胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、好ましくは、呼吸器疾患、腎疾患、消化器疾患などが発症している可能性が高いと診断することができる。反対に、例えば、本発明のタンパク質Bの濃度の  
25 上昇が検出された場合、例えば、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾

機能不全など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、脾臓疾患、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）など、好ましくは、呼吸器疾患、腎疾患、消化器疾患などが発症している可能性が高いと診断することが出来る。

本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質Cの濃度を定量することによって、本発明のタンパク質Cの濃度の減少が検出された場合、例えば、膵臓疾患（例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、糖尿病、高脂血症、胆汁うっ滞、または癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、膵臓疾患、中枢神経系疾患、消化器疾患、呼吸器疾患などが発症している可能性が高いと診断することができる。反対に、例えば、本発明のタンパク質Cの濃度の上昇が検出された場合、例えば、膵臓疾患（例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管



性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、糖尿病、高脂血症、胆汁うっ滞、または癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、膵臓疾患、中枢神経系疾患、消化器疾患、呼吸器疾患などが発症している可能性が高いと診断することが出来る。

本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質Dの濃度を定量することによって、  
本発明のタンパク質Dの濃度の減少が検出された場合、例えば、炎症性疾患  
（例、敗血症、肺炎、脳炎、髄膜炎、肝炎、心筋炎、胸膜炎など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、糖尿病性神経症、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、筋肉疾患（例、筋萎縮症など）、膵臓疾患（例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、熱傷、疼痛症候群（例、癌性疼痛、関連痛など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、炎症性疾患、リウマチ性疾患、糖尿病性神経症が発症している可能性が高いと診断することができる。反対に、例えば、本発明のタンパク質Dの濃度の上昇が検出された場合、例えば、炎症性疾患（例、敗血症、肺炎、脳炎、髄膜炎、肝炎、心

筋炎、胸膜炎など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、糖尿病性神経症、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、筋肉疾患（例、筋萎縮症など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、熱傷、疼痛症候群（例、癌性疼痛、関連痛など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、炎症性疾患、リウマチ性疾患、糖尿病性神経症などが発症している可能性が高いと診断することが出来る。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

#### 〔４〕遺伝子診断薬

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNA

Aの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（Genomics, 第5巻, 874～879頁（1989年）、  
5 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 第86巻, 2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより本発明のタンパク質A遺伝子の発現増加が検出された場合、例えば高脂血症、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、  
10 逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、  
15 リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、糖尿病、甲状腺機能低下、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、高脂血症、動脈硬化、生殖器疾患、消化器疾患などである可能性が高いと診断することが出来る。反対に、上記発現の低下が検出された場合、PCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、高脂血症、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾  
20  
25

患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、糖尿病、甲状腺機能低下、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、高脂血症、動脈硬化、生殖器疾患、消化器疾患などである可能性が高いと診断することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより本発明のタンパク質B遺伝子の発現増加が検出された場合、例えば腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患

（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、脾臓疾患、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）など、好ましくは、呼吸器疾患、腎疾患、消化器疾患などである可能性が高いと診断することが出来る。反対に、上記発現の低下が検出された場合、PCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、

消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患

（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多

5 発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巢神経症、卵巣嚢腫など）、脾臓疾患、癌（例、精巢腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）、糖尿病、高血圧、  
10 虚血後再灌流障害、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）など、好ましくは、  
15 呼吸器疾患、腎疾患、消化器疾患などである可能性が高いと診断することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより本発明のタンパク質C遺伝子の発現増加が検出された場合、例えば脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巢神経症、卵巣嚢腫など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、消化器疾患  
20 （例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、糖尿病、高脂血症、胆汁うっ滞、または癌（例、精巢腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、脾臓疾患、中枢神経系疾患、消化器疾患、呼吸器疾患などである可能性が高いと診断することが出来る。反対に、上記発現の低下が検出された場合、PCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、  
25

例えば、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、糖尿病、高脂血症、胆汁うっ滞、または癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、脾臓疾患、中枢神経系疾患、消化器疾患、呼吸器疾患などである可能性が高いと診断することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより本発明のタンパク質D遺伝子の発現増加が検出された場合、例えば、炎症性疾患（例、敗血症、肺炎、脳炎、髄膜炎、肝炎、心筋炎、胸膜炎など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、糖尿病性神経症、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、筋肉疾患（例、筋萎縮症など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、熱傷、疼痛症候群（例、癌性疼痛、関連痛など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、炎症性疾患、リウマチ性疾患、糖尿

病性神経症などである可能性が高いと診断することが出来る。反対に、上記発現の低下が検出された場合、PCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、炎症性疾患（例、敗血症、肺炎、脳炎、髄膜炎、肝炎、心筋炎、胸膜炎など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、糖尿病性神経症、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、筋肉疾患（例、筋萎縮症など）、膵臓疾患（例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、熱傷、疼痛症候群（例、癌性疼痛、関連痛など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、炎症性疾患、リウマチ性疾患、糖尿病性神経症などである可能性が高いと診断することができる。

#### 〔5〕 アンチセンスポリヌクレオチドを含有する医薬

本発明のタンパク質AをコードするDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができる本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは低毒性であり、生体内における上記タンパク質またはDNAの機能や活性を抑制することができるので、例えば、高脂血症、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息な

ど)、自己免疫疾患(例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど)、アレルギー性疾患(例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など)、リウマチ性疾患(例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など)、胸腺疾患、  
5 免疫不全(例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など)、糖尿病、甲状腺機能低下、循環器疾患(例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など)、脾臓疾患(例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など)、癌(例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、  
10 直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など)、好ましくは、高脂血症、動脈硬化、生殖器疾患、消化器疾患などの予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明のタンパク質BをコードするDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができる本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは低毒性であり、生体内における上記タンパク質またはDNAの機能や活性を抑制することができるので、例えば、腎疾患(例、腎不全、尿毒症など)、消化器疾患  
15 (例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など)、呼吸器疾患(例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、脾臓疾患(例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など)、自己免疫疾患(例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、

20 シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど)、アレルギー性疾患(例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など)、リウマチ性疾患(例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など)、胸腺疾患、免疫不全(例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など)、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など)、脾臓疾患、癌(例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、  
25 直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など)、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、中枢神経系疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど)など、好ましくは、呼吸器疾患、腎疾



患、消化器疾患などの予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明のタンパク質CをコードするDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができる本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは低毒性であり、生体内における上記タンパク質またはDNAの機能や活性を抑制することができるので、例えば、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巢嚢腫など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、糖尿病、高脂血症、胆汁うっ滞、または癌（例、精巣腫瘍、卵巢癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、脾臓疾患、中枢神経系疾患、消化器疾患、呼吸器疾患などの予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明のタンパク質DをコードするDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができる本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは低毒性であり、生体内における上記タンパク質またはDNAの機能や活性を抑制することができるので、例えば、炎症性疾患（例、敗血症、肺炎、脳炎、髄膜炎、肝炎、心筋炎、胸膜炎など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、糖尿病性神経症、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、

筋肉疾患（例、筋萎縮症など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、熱傷、疼痛症候群（例、癌性疼痛、関連痛など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、炎症性疾患、リウマチ性疾患、糖尿病性神経症などの予防・治療剤などとして使用することができる。

上記アンチセンスポリヌクレオチドを上記の予防・治療剤として使用する場合、公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。

例えば、該アンチセンスポリヌクレオチドを用いる場合、該アンチセンスポリヌクレオチドを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。該アンチセンスポリヌクレオチドは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

該アンチセンスポリヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、高脂血症の治療の目的で本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを消化器の特定の臓器に局所投与する場合、一般的に成人（体重60kg）においては、一日につき該アンチセンスポリヌクレオチドを約0.1～100mg投与する。

さらに、該アンチセンスポリヌクレオチドは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

さらに、本発明は、(i) 本発明のタンパク質をコードするRNAの一部とそれに相補的なRNAを含有する二重鎖RNA、

(ii) 前記二重鎖RNAを含有してなる医薬、

(iii) 本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有するリボザイム、  
(iv) 前記リボザイムを含有してなる医薬、  
(v) 前記リボザイムをコードする遺伝子（DNA）を含有する発現ベクターなども提供する。

5      上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、二重鎖RNA、リボザイムなども、本発明のDNAから転写されるRNAを破壊またはその機能を抑制することができる。

本発明のタンパク質AまたはそれをコードするDNAの機能を抑制することができる二重鎖RNA、リボザイムなどは、例えば、高脂血症、生殖器疾患  
10      （例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器疾患  
（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、  
15      アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、糖尿病、甲状腺機能低下、循環器疾患  
（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、脾臓疾患  
20      （例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、高脂血症、動脈硬化、生殖器疾患、消化器疾患などの予防・治療剤などとして使用することができる。

25      本発明のタンパク質BまたはそれをコードするDNAの機能を抑制することができる二重鎖RNA、リボザイムなどは、例えば、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢

胞性線維症などの脾機能不全など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、脾臓疾患、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）など、好ましくは、呼吸器疾患、腎疾患、消化器疾患などの予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明のタンパク質CまたはそれをコードするDNAの機能を抑制することができる二重鎖RNA、リボザイムなどは、例えば、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、糖尿病、高脂血症、胆汁うっ滞、または癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、脾臓疾患、中枢神経系疾患、消化器疾患、呼吸器疾患などの予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明のタンパク質DまたはそれをコードするDNAの機能を抑制することができる二重鎖RNA、リボザイムなどは、例えば、炎症性疾患（例、敗血症、肺炎、脳炎、髄膜炎、肝炎、心筋炎、胸膜炎など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマ

トーデスなど)、アレルギー性疾患(例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など)、リウマチ性疾患(例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など)、糖尿病性神経症、胸腺疾患、免疫不全(例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など)、消化器疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など)、呼吸器疾患(例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、循環器疾患(例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など)、肝臓疾患(例、肝硬変など)、腎疾患(例、腎不全、尿毒症など)、筋肉疾患(例、筋萎縮症など)、脾臓疾患(例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など)、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など)、熱傷、疼痛症候群(例、癌性疼痛、関連痛など)、癌(例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など)など、好ましくは、炎症性疾患、リウマチ性疾患、糖尿病性神経症などの予防・治療剤などとして使用することができる。

二重鎖RNAは、公知の方法(例、Nature, 411巻, 494頁, 2001年)に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

リボザイムは、公知の方法(例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221頁, 2001年)に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、公知のリボザイムの配列の一部を本発明のタンパク質をコードするRNAの一部に置換することによって製造することができる。本発明のタンパク質をコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得るコンセンサス配列NUX(式中、Nはすべての塩基を、XはG以外の塩基を示す)の近傍の配列などが挙げられる。

上記の二重鎖RNAまたはリボザイムを上記予防・治療剤として使用する場合、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。また、前記(v)の発現ベクターは、公知の遺伝子治療法などと同様に用い、上記予防・治療剤として使用する。

〔6〕本発明のDNAを有する動物の作出

本発明は、外来性の本発明のタンパク質をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

5       すなわち、本発明は、

- （1）本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
- （2）非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記（1）記載の動物、
- （3）ゲッ歯動物がマウスまたはラットである上記（2）記載の動物、および
- （4）本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において

10       発現しうる組換えベクターなどを提供する。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA導入動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でか

15       つ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを導入することによって作出することができる。また、該DNA導入方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを導入し、細胞培養、組織培

20       養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA導入動物を作出することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なか

25       でも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F<sub>1</sub>系統、BDF<sub>1</sub>系統、B6D2F<sub>1</sub>系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar、SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

5 本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

10 該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。

15 本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に導入するにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを導入する場合、これと相溶性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA導入哺乳動物を作出することができる。

20 本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、λファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、(i) ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、

J Cウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど) に由来するDNAのプロモーター、(ii) 各種哺乳動物(ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど) 由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンI I、ウロプラキンI I、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 $\beta$ 、ケラチンK 1, K 10およびK 14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ $\beta$ Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリホスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ(一般にT i e 2と略される)、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素(Na, K-ATPase)、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原(H-2L)、H-ras、レニン、ドーパミン $\beta$ -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO)、ポリペプチド鎖延長因子1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )、 $\beta$ アクチン、 $\alpha$ および $\beta$ ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部(VNP)、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 $\alpha$ アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )のプロモーター、ヒトおよびニワトリ $\beta$ アクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA導入哺乳動物において目的とするmRNAの転写を終結する配列(一般にターミネーターと呼ばれる)を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻



訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のタンパク質の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なポリペプチドの翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は導入動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを導入した非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

5 本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のタンパク質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質に関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

10 また、本発明の外来性正常DNAを導入した哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

15 一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

25 本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル

動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

5 また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

10 また、本発明の外来異常DNAを導入した哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質またはその機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA導入動物のその他の利用可能性として、例えば、

(i) 組織培養のための細胞源としての使用、

15 (ii) 本発明のDNA導入動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析する、またはDNAにより発現されたポリペプチド組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するタンパク質との関連性についての解析、

(iii) DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

20 (iv) 上記(iii)記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

(v) 本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

25 さらに、本発明のDNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA導入動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA導入細胞の取得、その培養

またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA導入動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

#### 〔7〕 ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- (2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された上記（1）記載の胚幹細胞、
- (3) ネオマイシン耐性である上記（1）記載の胚幹細胞、
- (4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記（1）記載の胚幹細胞、
- (5) ゲッ歯動物がマウスである上記（4）記載の胚幹細胞、
- (6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- (7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる上記（6）記載の非ヒト哺乳動物、
- (8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記（6）記載の非ヒト哺乳動物、
- (9) ゲッ歯動物がマウスである上記（8）記載の非ヒト哺乳動物、および

(10) 上記(7)記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、あるいは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なmRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上の

DNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

5 また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知のEvansとKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺傳的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/  
10 6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF<sub>1</sub>マウス(C57BL/6とDBA/2とのF<sub>1</sub>)を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF<sub>1</sub>マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺傳的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。  
15

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

20 また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10<sup>6</sup>個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、  
25 培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（1～10000U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001～0.5%トリプシン/0.1～5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1～3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年〕、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをロックアウトさせることができる。

本発明のDNAがロックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のD



NA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがロックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがロックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

- 5       さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

- 15       また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

〔7 a〕本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して予防・治療効果を有する化合物のスクリーニング方法

- 20       本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して予防・治療効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

- 25       すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することの特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して予防・治療効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、

合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の予防・治療効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

例えば、高脂血症に対して治療効果を有する化合物のスクリーニングをする場合、普通食あるいはコレステロール含有普通食で飼育した本発明のタンパク質AをコードするDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の糞便中の総胆汁酸量または血漿総コレステロール量を経時的に測定する。

例えば、腎不全に対して予防・治療効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のタンパク質BをコードするDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の血中クレアチニン量や、尿タンパク質量などを経時的に測定する。

例えば、糖尿病に対して治療効果を有する化合物のスクリーニングをする場合、本発明のタンパク質CをコードするDNA発現不全非ヒト哺乳動物に糖負荷処置を行ない、糖負荷処置前または処置後に試験化合物を投与し、該動物の血糖値、尿量、尿糖および体重変化などを経時的に測定する。

例えば、慢性関節リウマチに対して予防・治療効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のタンパク質DをコードするDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の関節の腫れの体積などを経時的に測定したり、エックス線、MRI、組織学的手法などにより関節破壊の程度を経時的に評価する。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質の欠損や損傷などによって引き起

こされる疾患に対して予防・治療効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

- 5       該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、  
10       ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

      該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして製造することができる。

- 15       このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたはその他の哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の高脂血症の患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の高  
20       脂血症の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg、好ましくは0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。  
25

〔7b〕本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化

## 化合物のスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）、可溶性アルカリホスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりに $\beta$ -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -ガラクトピラノシド（X-gal）のような $\beta$ -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液（PBS）で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mMEDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ反応を

停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、有機酸など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

本発明のタンパク質AをコードするDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質Aの発現を促進し、該タンパク質の機能を促進することができるので、例えば、高脂血症、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、糖尿病、甲状腺機能低下、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）、好ましくは、高

脂血症、動脈硬化、生殖器疾患、消化器疾患などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

本発明のタンパク質AをコードするDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質Aの発現を阻害し、該タンパク質の機能を阻害することができるので、例えば高脂血症、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、糖尿病、甲状腺機能低下、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）、好ましくは、高脂血症、動脈硬化、生殖器疾患、消化器疾患などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

本発明のタンパク質BをコードするDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質Bの発現を促進し、該タンパク質の機能を促進することができるので、例えば、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショッ

ク、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、脾臓疾患、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）など、好ましくは、呼吸器疾患、腎疾患、消化器疾患などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

本発明のタンパク質BをコードするDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質Bの発現を阻害し、該タンパク質の機能を阻害することができるので、例えば腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、膵臓疾患（例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、脾臓疾患、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）など、好ましくは、呼吸器疾患、腎疾患、消化器疾患などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

本発明のタンパク質CをコードするDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質Cの発現を促進し、該タンパク質の機能を促進することができるので、例えば、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、糖尿病、高脂血症、胆汁うっ滞、または癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、脾臓疾患、中枢神経系疾患、消化器疾患、呼吸器疾患などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

本発明のタンパク質CをコードするDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質Cの発現を阻害し、該タンパク質の機能を阻害することができるので、例えば脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、糖尿病、高脂血症、胆汁うっ滞、または癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、脾臓疾患、中枢神経系疾患、消化器疾患、呼吸器疾患などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

本発明のタンパク質DをコードするDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質Dの発現を促進し、該タンパク質の機能を促進することができるので、例えば、炎症性疾患（例、敗血症、



肺炎、脳炎、髄膜炎、肝炎、心筋炎、胸膜炎など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、糖尿病性神経症、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、筋肉疾患（例、筋萎縮症など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、熱傷、疼痛症候群（例、癌性疼痛、関連痛など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、炎症性疾患、リウマチ性疾患、糖尿病性神経症などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

本発明のタンパク質DをコードするDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質Dの発現を阻害し、該タンパク質の機能を阻害することができるので、例えば、炎症性疾患（例、敗血症、肺炎、脳炎、髄膜炎、肝炎、心筋炎、胸膜炎など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、糖尿病性神経症、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、Q

T延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、筋肉疾患（例、筋萎縮症など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、熱傷、疼痛症候群（例、癌性疼痛、関連痛など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、炎症性疾患、リウマチ性疾患、糖尿病性神経症などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたはその他の哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の高脂血症患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の高脂血症患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg、好ましくは0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物

を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の高脂血症患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに

5 対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の高脂血症患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg、好ましくは0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

10 このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、

15 その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子導入動物）を作出すれば、特異的にそのポリペプチドを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

20

#### 〔8〕本発明のタンパク質Dに対するリガンドの決定

本発明のタンパク質Dもしくはその部分ペプチドまたはその塩は、本発明の

25 タンパク質Dまたはその塩に対するリガンドを探索し、または決定するための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明のタンパク質Dもしくはその部分ペプチドまたはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明のタンパク質Dに対するリガンドの決定方法を提供する。

試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP（例、PACAP27、PACAP38）、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リレйтеッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレйтеッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー（例、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、GCP-2、PF4、IP-10、Mig、PBSF/SDF-1などのCXCケモカインサブファミリー；MCAF/MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、eotaxin、RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、HCC-1、MIP-3 $\alpha$ /LARC、MIP-3 $\beta$ /ELC、I-309、TARC、MIPF-1、MIPF-2/eotaxin-2、MDC、DC-CK1/PARC、SLCなどのCCケモカインサブファミリー；lymphotactinなどのCケモカインサブファミリー；fractalkineなどのCX3Cケモカインサブファミリー等）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、リゾホスファチジン酸（LPA）、スフィンゴシン1-リン酸、パニロイド、ヌクレオチドなど）の他に、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど）の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明のタンパク質Dに添加し、カチオンチャネル活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明のタンパク質Dを用いるか、または組換え型タンパク質Dの発現系を構築し、該発現系を用いたリガンド結合アッセイ系を用いることによって、本発明のタンパク質Dに結合してカ

チオンチャネル活性（例、 $\text{Ca}^{2+}$ チャネル活性など）を有する化合物（例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、ヌクレオチドなど）またはその塩を決定する方法である。

5 本発明のリガンド決定方法においては、本発明のタンパク質Dと試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該タンパク質Dまたは該部分ペプチドに対する試験化合物の結合量や、カチオンチャネル活性などを測定することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

10 (i) 標識した試験化合物を、本発明のタンパク質Dもしくはその部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該タンパク質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のタンパク質Dまたはその塩に対するリガンドの決定方法、

15 (ii) 標識した試験化合物を、本発明のタンパク質Dを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のタンパク質Dまたはその塩に対するリガンドの決定方法、

20 (iii) 標識した試験化合物を、本発明のタンパク質DをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したタンパク質Dに接触させた場合における、標識した試験化合物の該タンパク質Dまたはその塩に対する結合量を測定しすることを特徴とする本発明のタンパク質Dに対するリガンドの決定方法、

25 (iv) 試験化合物を、本発明のタンパク質Dを含有する細胞に接触させた場合における、タンパク質Dを介したカチオンチャネル活性（例、 $\text{Ca}^{2+}$ チャネル活性など）を測定することを特徴とする本発明のタンパク質Dまたはその塩に対するリガンドの決定方法を提供する。

特に、上記 (i) ~ (iii) の試験を行ない、試験化合物が本発明のタンパク質Dに結合することを確認した後に、上記 (iv) の試験を行うことが好ましい。

まず、リガンド決定方法に用いるタンパク質Dとしては、上記した本発明の

タンパク質Dまたは本発明の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたタンパク質が適している。

5 本発明のタンパク質Dを製造するには、上記の発現方法が用いられるが、該タンパク質DをコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行うことが好ましい。目的とするタンパク質部分をコードするDNA断片には、通常、相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のタンパク質DをコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核  
10 多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したチャネルの量と質の検査は公知の方法で行うことができる。例  
15 えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行うことができる。

したがって、本発明のリガンド決定方法において、本発明のタンパク質Dもしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有するものとしては、公知の方法に従って精製したタンパク質Dもしくはその部分ペプチドまたはその塩であつてもよいし、該タンパク質Dを含有する細胞またはその細胞膜画分を用いてもよい。  
20

本発明のリガンド決定方法において、本発明のタンパク質Dを含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法は公知の方法に従って行うことができる。  
25

本発明のタンパク質Dを含有する細胞としては、本発明のタンパク質Dを発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、公知の方法で得られる細胞膜が多

く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。

- 5 細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500~3000rpm) で短時間 (通常、約1~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000~30000rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したタンパク質Dと細胞由来のリン脂質や膜タンパク質などの膜成分が多く含まれる。

- 10 該タンパク質Dを含有する細胞やその膜画分中のタンパク質Dの量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロット
- 15 で大量の試料を測定できるようになる。

本発明のタンパク質Dまたはその塩に対するリガンドを決定する上記の (i) ~ (iii) の方法を実施するためには、適当なタンパク質D画分と、標識した試験化合物が必要である。

- 20 タンパク質D画分としては、天然型のタンパク質D画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型チャネル画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、カチオンチャネル活性などを示す。

- 25 標識した試験化合物としては、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識したアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP (例、PACAP 27, PACAP 38)、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP (バソアクティブ インテスティナル アンド リイテッド ポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP (カ

ルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー(例、IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2, ENA-78, GCP-2, PF4, IP-10, Mig, PB

5 SF/SDF-1などのCXCケモカインサブファミリー; MCAF/MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, eotaxin, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , HCC-1, MIP-3 $\alpha$ /LARC, MIP-3 $\beta$ /ELC, I-309, TARC, MIPF-1, MIPF-2/eotaxin-2, MDC, DC-CK1/PARC, SLCなどのCCケモカインサブファミリー; lymphotactinなどのCケモカインサブファミリー

10 ー; fractalkineなどのCX3Cケモカインサブファミリー等)、エンドセリン、エンテログastrin、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、リゾホスファチジン酸(LP

15 A)、スフィンゴシン1-リン酸、バニロイド、ヌクレオチドなどが好適である。

具体的には、本発明のタンパク質Dまたはその塩に対するリガンドの決定方法を行うには、まず本発明のタンパク質Dを含有する細胞または細胞の膜面分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりチャンネル標品を調製する。バッファーには、pH4~10(望ましくはpH6~8)のリン酸バッ

20 ー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとタンパク質Dとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>(花王-アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種タンパク質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるリセプター

25 やリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64(ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01~10mlの該タンパク質溶液に、一定量(5000~500000cpm)の[<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チュー



ブも用意する。反応は約0～50℃、望ましくは約4～37℃で、約20分～24時間、望ましくは約30分～3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいはγ-カウンターで計測する。全結合量 (B) から非特異的結合量 (NSB) を引いたカウント (B-NSB) が0cpmを越える試験化合物を

5 本発明のタンパク質Dまたはその塩に対するリガンドとして選択することができる。

本発明のタンパク質Dまたはその塩に対するリガンドを決定する上記の (iv) の方法を実施するためには、該タンパク質Dを介するカチオンチャネル活性 (例、Ca<sup>2+</sup>チャネル活性など) を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、タンパク質Dを含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、蛍光Ca<sup>2+</sup>プローブ (例、Fura-2、Fluo-3など) を取り込ませた後に、試験化合物な

10 どを添加して、一定時間FLIPR (モレキュラー・デバイス社製) などにより蛍光強度を測定する。 本発明のタンパク質Dまたはその塩に結合するリガンド決定用キットは、本発明のタンパク質Dもしくはその塩、本発明の部分ペプチドもしくはその塩、本発明のタンパク質Dを含有する細胞、または本発明のタンパク質Dを含有する細胞の膜画分などを含有するものである。

20 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

25 DNA : デオキシリボ核酸  
cDNA : 相補的デオキシリボ核酸  
A : アデニン  
T : チミン

	G	: グアニン
	C	: シトシン
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
5	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
10	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	G l y	: グリシン
	A l a	: アラニン
	V a l	: バリン
15	L e u	: ロイシン
	I l e	: イソロイシン
	S e r	: セリン
	T h r	: スレオニン
	C y s	: システイン
20	M e t	: メチオニン
	G l u	: グルタミン酸
	A s p	: アスパラギン酸
	L y s	: リジン
	A r g	: アルギニン
25	H i s	: ヒスチジン
	P h e	: フェニルアラニン
	T y r	: チロシン
	T r p	: トリプトファン
	P r o	: プロリン

A s n : アスパラギン

G l n : グルタミン

p G l u : ピログルタミン酸

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表

5 記する。

M e : メチル基

E t : エチル基

B u : ブチル基

P h : フェニル基

10 T C : チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

T o s : p-トルエンスルフォニル

C H O : ホルミル

B z l : ベンジル

C l<sub>2</sub>-Bz l : 2, 6-ジクロロベンジル

15 B o m : ベンジルオキシメチル

Z : ベンジルオキシカルボニル

C l - Z : 2-クロロベンジルオキシカルボニル

B r - Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル

B o c : t-ブトキシカルボニル

20 D N P : ジニトロフェニル

T r t : トリチル

B u m : t-ブトキシメチル

F m o c : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル

H O B t : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール

25 H O O B t : 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-  
1, 2, 3-ベンゾトリアジン

H O N B : 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド

D C C : N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

実施例1で取得した377アミノ酸のヒトTCH230タンパク質のアミノ酸配列を示す。

5      〔配列番号：2〕

配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するヒトTCH230タンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕

実施例1で用いられたプライマーOFの塩基配列を示す。

10     〔配列番号：4〕

実施例1で用いられたプライマーOR1の塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕

実施例1で用いられたプライマーOF1の塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

15     実施例1で用いられたプライマーORの塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕

実施例1、実施例13で用いられたプライマーSP6の塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

20     実施例1、実施例13、実施例18、実施例25、実施例33で用いられたプライマーT7の塩基配列を示す。

〔配列番号：9〕

実施例1、実施例18で用いられたプライマーB1の塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

実施例1、実施例18で用いられたプライマーF1の塩基配列を示す。

25     〔配列番号：11〕

実施例1で取得したTCH230全長遺伝子を含むヒト小腸cDNA由来のcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕

実施例1で取得したTCH230全長遺伝子を含むヒト骨格筋cDNA由来

のcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：13〕

配列番号：14で表されるアミノ酸配列を含有するヒトTCH230タンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

5      〔配列番号：14〕

配列番号：13で表される塩基配列がコードするアミノ酸配列を含有するヒトTCH230タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：15〕

10      実施例2、実施例19、実施例38で用いられたプライマーTFの塩基配列を示す。

〔配列番号：16〕

実施例2、実施例19、実施例38で用いられたプライマーTRの塩基配列を示す。

〔配列番号：17〕

15      実施例2、実施例19、実施例38で用いられたTaqManプローブT1の塩基配列を示す。

〔配列番号：18〕

実施例1で取得したヒトTCH234タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：19〕

20      配列番号：19で表されるアミノ酸配列を有するヒトTCH234タンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：20〕

実施例3で用いられたプライマーAP1の塩基配列を示す。

〔配列番号：21〕

25      実施例3で用いられたプライマーrr0の塩基配列を示す。

〔配列番号：22〕

実施例3で用いられたプライマーAP2の塩基配列を示す。

〔配列番号：23〕

実施例3で用いられたプライマーrr1の塩基配列を示す。

〔配列番号：24〕

実施例4で用いられたプライマーff1の塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕

5 実施例4、実施例5、実施例25で用いられたプライマーff2の塩基配列を示す。

〔配列番号：26〕

実施例5で用いられたプライマーORFF1の塩基配列を示す。

〔配列番号：27〕

実施例5で用いられたプライマーORFR1の塩基配列を示す。

10 〔配列番号：28〕

実施例5で用いられたプライマーORFF2の塩基配列を示す。

〔配列番号：29〕

実施例5で用いられたプライマーORFR2の塩基配列を示す。

〔配列番号：30〕

15 実施例5で用いられたプライマーM13Fの塩基配列を示す

〔配列番号：31〕

実施例5で用いられたプライマーM13Rの塩基配列を示す。

〔配列番号：32〕

20 実施例6、実施例27、実施例28、実施例38で用いられたプライマーTMFの塩基配列を示す。

〔配列番号：33〕

実施例6、実施例27、実施例28、実施例38で用いられたプライマーTMRの塩基配列を示す。

〔配列番号：34〕

25 実施例5で用いられたプライマーF2の塩基配列を示す

〔配列番号：35〕

実施例5、実施例25で用いられたプライマーF3の塩基配列を示す。

〔配列番号：36〕

実施例5で用いられたプライマーR1の塩基配列を示す。

〔配列番号：37〕

実施例5、実施例25で用いられたプライマーR2の塩基配列を示す。

〔配列番号：38〕

5 実施例6、実施例27、実施例28、実施例38で用いられたTaqMan  
プローブP1の塩基配列を示す。

〔配列番号：39〕

実施例3で取得したcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：40〕

実施例4で取得したcDNAの塩基配列を示す。

10 〔配列番号：41〕

実施例5で取得したcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：42〕

実施例7で取得したヒトTCH212タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：43〕

15 配列番号：42で表されるアミノ酸配列を有するヒトTCH212タンパク  
質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：44〕

実施例7で用いられたプライマーA3の塩基配列を示す。

〔配列番号：45〕

20 実施例7で用いられたプライマーB3の塩基配列を示す。

〔配列番号：46〕

実施例7で用いられたプライマーSP6の塩基配列を示す。

〔配列番号：47〕

実施例7で用いられたプライマーT7の塩基配列を示す。

25 〔配列番号：48〕

実施例7、実施例33で用いられたプライマーA2の塩基配列を示す。

〔配列番号：49〕

実施例7、実施例33で用いられたプライマーB1の塩基配列を示す。

〔配列番号：50〕

実施例 7、実施例 33 で用いられたプライマー B 2 の塩基配列を示す。

〔配列番号：51〕

実施例 7、実施例 33 で用いられたプライマー F 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：52〕

5 実施例 7、実施例 33 で用いられたプライマー F 2 の塩基配列を示す。

〔配列番号：53〕

実施例 7、実施例 33 で用いられたプライマー F 3 の塩基配列を示す。

〔配列番号：54〕

実施例 7、実施例 33 で用いられたプライマー F 4 の塩基配列を示す。

10 〔配列番号：55〕

実施例 7、実施例 33 で用いられたプライマー F 5 の塩基配列を示す。

〔配列番号：56〕

実施例 7、実施例 33 で用いられたプライマー R 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：57〕

15 実施例 7、実施例 33 で用いられたプライマー R 2 の塩基配列を示す。

〔配列番号：58〕

実施例 7、実施例 33 で用いられたプライマー R 3 の塩基配列を示す。

〔配列番号：59〕

実施例 7、実施例 33 で用いられたプライマー R 4 の塩基配列を示す。

20 〔配列番号：60〕

実施例 7 で取得したヒト TCH212 全長遺伝子を含む cDNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：61〕

実施例 7 で取得したヒト TCH212 クローン # 2 の全長遺伝子を含む cDNA の塩基配列を示す。

25 〔配列番号：62〕

〔配列番号：62〕

実施例 7 で取得したヒト TCH212 クローン # 2 の ORF の塩基配列を示す。

〔配列番号：63〕



実施例 8、実施例 38 で用いられたプライマー T F の塩基配列を示す。

〔配列番号：64〕

実施例 8、実施例 38 で用いられたプライマー T R の塩基配列を示す。

〔配列番号：65〕

- 5 実施例 8、実施例 38 で用いられた T a q M a n プローブ T 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：66〕

ヒト T C H 2 0 0 タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：67〕

- 10 配列番号：66 で表されるアミノ酸配列を含有するヒト T C H 2 0 0 タンパク質をコードする DNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：68〕

実施例 9 で用いられたプライマー A P 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：69〕

- 15 実施例 9 で用いられたプライマー R 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：70〕

実施例 9 で用いられたプライマー A P 2 の塩基配列を示す。

〔配列番号：71〕

実施例 9 で用いられたプライマー r r 2 の塩基配列を示す。

- 20 〔配列番号：72〕

実施例 9 で用いられたプライマー M 1 3 F の塩基配列を示す。

〔配列番号：73〕

実施例 9 で用いられたプライマー M 1 3 R の塩基配列を示す。

〔配列番号：74〕

- 25 実施例 9 で用いられたプライマー r r 4 の塩基配列を示す。

〔配列番号：75〕

実施例 9 で用いられたプライマー r r 6 の塩基配列を示す。

〔配列番号：76〕

実施例 10 で用いられたプライマー r 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 7 7〕

実施例 1 0 で用いられたプライマー r 2 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 7 8〕

実施例 1 0 で用いられたプライマー f 1 の塩基配列を示す

5 〔配列番号： 7 9〕

実施例 1 0 で用いられたプライマー f 2 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 8 0〕

実施例 1 0 で用いられたプライマー f 4 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 8 1〕

10 実施例 1 1 で用いられたプライマー F 0 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 8 2〕

実施例 1 1 で用いられたプライマー R 7 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 8 3〕

実施例 1 1 で用いられたプライマー F 0 0 の塩基配列を示す。

15 〔配列番号： 8 4〕

実施例 1 1 で用いられたプライマー R 0 0 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 8 5〕

実施例 1 1 で用いられたプライマー F 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 8 6〕

20 実施例 1 1 で用いられたプライマー F 2 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 8 7〕

実施例 1 1 で用いられたプライマー F 5 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 8 8〕

実施例 1 1 で用いられたプライマー F 7 の塩基配列を示す。

25 〔配列番号： 8 9〕

実施例 1 1 で用いられたプライマー f f 3 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 9 0〕

実施例 1 1 で用いられたプライマー f f 4 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 9 1〕

実施例 11 で用いられたプライマー f 3 の塩基配列を示す。

〔配列番号：92〕

実施例 11 で用いられたプライマー r r 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：93〕

5 実施例 11 で用いられたプライマー r r 3 の塩基配列を示す。

〔配列番号：94〕

実施例 12、実施例 37、実施例 38 で用いられたプライマー T M F の塩基配列を示す。

〔配列番号：95〕

10 実施例 12、実施例 37、実施例 38 で用いられたプライマー T M R の塩基配列を示す。

〔配列番号：96〕

実施例 12、実施例 37、実施例 38 で用いられた T a q M a n プローブ P 1 の塩基配列を示す。

15 〔配列番号：97〕

実施例 9 で取得した c D N A の塩基配列を示す。

〔配列番号：98〕

実施例 9 で取得した c D N A の塩基配列を示す。

〔配列番号：99〕

20 実施例 10 で取得した c D N A の塩基配列を示す。

〔配列番号：100〕

実施例 10 で取得した c D N A の塩基配列を示す。

〔配列番号：101〕

実施例 10 で取得した c D N A の塩基配列を示す。

25 〔配列番号：102〕

実施例 11 で取得した c D N A の塩基配列を示す。

〔配列番号：103〕

配列番号：66 で表されるアミノ酸配列を含有するヒト T C H 2 0 0 タンパク質をコードする D N A の塩基配列を示す。

〔配列番号：104〕

実施例13で取得した373アミノ酸のマウスTCH230タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：105〕

- 5 配列番号：104で表されるアミノ酸配列を有するマウスTCH230タンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す

〔配列番号：106〕

実施例13で用いられたプライマーm230A1の塩基配列を示す。

〔配列番号：107〕

- 10 実施例13で用いられたプライマーm230B2の塩基配列を示す。

〔配列番号：108〕

実施例13で用いられたプライマーm230F1の塩基配列を示す。

〔配列番号：109〕

実施例13で用いられたプライマーm230F2の塩基配列を示す。

- 15 〔配列番号：110〕

実施例13で用いられたプライマーm230R1の塩基配列を示す。

〔配列番号：111〕

実施例13で用いられたプライマーm230R2の塩基配列を示す。

〔配列番号：112〕

- 20 実施例13で取得したマウスTCH230全長遺伝子を含むcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：113〕

実施例14、実施例15、実施例40で用いられたプライマーm230TFの塩基配列を示す。

- 25 〔配列番号：114〕

実施例14、実施例15、実施例40で用いられたプライマーm230TRの塩基配列を示す。

〔配列番号：115〕

実施例14、実施例15、実施例40で用いられたTaqManプローブm

230T1の塩基配列を示す。

〔配列番号：116〕

実施例16で同定したラットTCH230遺伝子cDNAの部分配列の塩基配列を示す。

5 〔配列番号：117〕

実施例16で用いられたプライマーr230OFの塩基配列を示す。

〔配列番号：118〕

実施例16で用いられたプライマーr230ORの塩基配列を示す。

〔配列番号：119〕

10 実施例17で用いられたプライマーr230TFの塩基配列を示す。

〔配列番号：120〕

実施例17で用いられたプライマーr230TRの塩基配列を示す。

〔配列番号：121〕

15 実施例17で用いられたTaqManプローブr230T1の塩基配列を示す。

〔配列番号：122〕

実施例18で用いられたプライマー230OF2の塩基配列を示す。

〔配列番号：123〕

実施例18で用いられたプライマー230OR2の塩基配列を示す。

20 〔配列番号：124〕

実施例18で用いられたプライマーBGHRVの塩基配列を示す。

〔配列番号：125〕

実施例21で同定したマウスTCH234遺伝子cDNAの部分配列の塩基配列を示す。

25 〔配列番号：126〕

実施例21で用いられたプライマーm234-1485Fの塩基配列を示す。

〔配列番号：127〕

実施例21で用いられたプライマーm234-1801Rの塩基配列を示す。

〔配列番号：128〕

実施例 2 2、実施例 3 9 で用いられたプライマー m 2 3 4 - T M F の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 2 9〕

5 実施例 2 2、実施例 3 9 で用いられたプライマー m 2 3 4 - T M R の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 3 0〕

実施例 2 2、実施例 3 9 で用いられたプライマー m 2 3 4 T 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 3 1〕

10 実施例 2 3 で同定したラット T C H 2 3 4 遺伝子 c D N A の部分配列の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 3 2〕

実施例 2 3 で用いられたプライマー r 2 3 4 - 8 1 5 F の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 3 3〕

15 実施例 2 3 で用いられたプライマー r 2 3 4 - 1 1 7 7 R の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 3 4〕

実施例 2 4 で用いられたプライマー r 2 3 4 - T M F の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 3 5〕

実施例 2 4 で用いられたプライマー r 2 3 4 - T M R の塩基配列を示す。

20 〔配列番号：1 3 6〕

実施例 2 4 で用いられたプライマー r 2 3 4 - P 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 3 7〕

実施例 2 5 で用いられたプライマー 2 3 4 O F の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 3 8〕

25 実施例 2 5 で用いられたプライマー 2 3 4 O R の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 3 9〕

実施例 2 5 で用いられたプライマー 2 3 4 F 2 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 4 0〕

実施例 2 5 で用いられたプライマー 2 3 4 F 2 2 の塩基配列を示す。

〔配列番号：141〕

実施例25で用いられたプライマー234F23の塩基配列を示す。

〔配列番号：142〕

実施例25で用いられたプライマー234R24の塩基配列を示す。

5 〔配列番号：143〕

実施例29で同定したマウスTCH212遺伝子cDNAの部分配列の塩基配列を示す。

〔配列番号：144〕

10 実施例29、実施例31で用いられたプライマーm212A1の塩基配列を示す。

〔配列番号：145〕

実施例29、実施例31で用いられたプライマーm212B1の塩基配列を示す。

〔配列番号：146〕

15 実施例30で用いられたプライマーm212TFの塩基配列を示す。

〔配列番号：147〕

実施例30で用いられたプライマーm212TRの塩基配列を示す。

〔配列番号：148〕

20 実施例30で用いられたTaqManプローブm212T1の塩基配列を示す。

〔配列番号：149〕

実施例31で同定したラットTCH212遺伝子cDNAの部分配列の塩基配列を示す

〔配列番号：150〕

25 実施例32で用いられたプライマーr212TFの塩基配列を示す。

〔配列番号：151〕

実施例32で用いられたプライマーr212TRの塩基配列を示す。

〔配列番号：152〕

実施例32で用いられたプライマーr212T1の塩基配列を示す。

〔配列番号：153〕

実施例33で用いられたプライマー212OFの塩基配列を示す。

〔配列番号：154〕

実施例33で用いられたプライマー212ORの塩基配列を示す。

5 〔配列番号：155〕

実施例34で同定したマウスTCH200遺伝子cDNAの部分配列の塩基配列を示す。

〔配列番号：156〕

実施例34で用いられたプライマーm200A1の塩基配列を示す。

10 〔配列番号：157〕

実施例34で用いられたプライマーm200B1の塩基配列を示す。

〔配列番号：158〕

実施例34、実施例35で用いられたプライマーm200A2の塩基配列を示す。

15 〔配列番号：159〕

実施例34、実施例35で用いられたプライマーm200B2の塩基配列を示す。

〔配列番号：160〕

実施例35で用いられたTaqManプローブm200T1の塩基配列を示す。

20

〔配列番号：161〕

実施例36で用いられたプライマーTCH200Fの塩基配列を示す。

〔配列番号：162〕

実施例36で用いられたプライマーTCH200Rの塩基配列を示す。

25

〔配列番号：163〕

実施例36で用いられたプライマーT7の塩基配列を示す。

〔配列番号：164〕

実施例36で用いられたプライマーAFの塩基配列を示す。

〔配列番号：165〕



実施例 3 6 で用いられたプライマー B F の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 6 6〕

実施例 3 6 で用いられたプライマー C F の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 6 7〕

5 実施例 3 6 で用いられたプライマー D F の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 6 8〕

実施例 3 6 で用いられたプライマー B G H R V の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 6 9〕

実施例 3 6 で用いられたプライマー D R の塩基配列を示す。

10 〔配列番号：1 7 0〕

実施例 3 6 で用いられたプライマー C R の塩基配列を示す

〔配列番号：1 7 1〕

実施例 3 6 で用いられたプライマー B R の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 7 2〕

15 実施例 3 6 で用いられたプライマー A R の塩基配列を示す。

後述の実施例 1 で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) TOP10/pCR-BluntII-TCH230は、2002年1月31日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所  
20 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7869として、2002年1月17日から大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 (郵便番号532-8686) の財団法人発酵研究所 (IFO) に受託番号IFO 16749として寄託されている。

後述の実施例 3 で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) TOP10/pCR-BluntII-TCH234は、2002年2月18日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所  
25 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7906として、2002年2月7日から大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 (郵便番号532-8686) の財団法人発酵研究所 (IFO) に受託番号IFO 16758として寄託されている。

後述の実施例 7 で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ (*Escherichia*

coli) JM109/pCR-BluntII-TCH212は、2002年2月12日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7888として、2002年1月31日から大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号（郵便番号532-8686）の財団法人発酵研究所（IF0）に受託番号IF0 16755として寄託されている。

後述の実施例9で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）TOP10/pCR-BluntII-TCH200は、2002年2月4日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7874として、2002年1月22日から大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号（郵便番号532-8686）の財団法人発酵研究所（IF0）に受託番号IF0 16750として寄託されている。

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング（Molecular cloning）に記載されている方法に従った。

#### 実施例1

##### ヒトTCH230遺伝子cDNAのクローニング

2種のプライマーDNA、プライマーOF（配列番号：3）およびプライマーOR1（配列番号：4）を用いて、ヒト小腸Marathon-Ready cDNAおよびヒト骨格筋Marathon-Ready cDNA（いずれもクロンテック社製）に対して、Pyrobest DNA Polymerase（宝酒造社製）により、以下の条件（1）～（3）で一次PCRを行った。

（1）94℃ 2分間

（2）98℃ 10秒間－68℃ 30秒間－72℃ 3分間を30サイクル

（3）72℃ 10分間

さらに、この一次PCRの産物を鋳型として、プライマーOF1（配列番号：5）とプライマーOR（配列番号：6）を用いて、Pyrobest DNA polymerase（宝酒造社製）により以下の条件（4）～（6）でnested PCRを行った。

(4) 94℃ 2分間

(5) 98℃ 10秒間－68℃ 30秒間－72℃ 3分間を35サイクル

(6) 72℃ 10分間

5 得られた増幅産物をZero Blunt TOP0 Cloning kit (インビトロジェン社製) を用いてクローニングし、プラスミドpCR-BluntII-TCH230を得た。

これをプライマーDNA [プライマーSP6 (配列番号: 7)、プライマーT7 (配列番号: 8)、プライマーB1 (配列番号: 9)、プライマーF1 (配列番号: 10)] およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて反応を行い、挿入されているcDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて決定した。その結果、ヒト小腸cDNAから取得したクローンは1152個の塩基配列を有していた (配列番号: 11)。該cDNA断片には377個のアミノ酸配列 (配列番号: 1) がコードされており (配列番号: 2)、該アミノ酸配列を有するタンパク質を、ヒトTCH230タンパク質と命名した。

15

該cDNA断片を含むプラスミドを有する形質転換体を、エシェリヒア コリ (Escherichia coli) TOP10/pCR-BluntII-TCH230と命名した。

また、ヒト骨格筋cDNAから取得したクローンは、1箇所 (配列番号: 11で表される塩基配列の340番目) に塩基置換が認められた。この塩基置換A340Gは、Ile→Valのアミノ酸置換を伴うものであり、遺伝子多型 (SNPs) に由来する可能性があると考えられる。このクローンの有するcDNA全長の塩基配列を配列番号: 12に、この塩基配列中のORFの塩基配列を配列番号: 13に示す。配列番号: 13で表される塩基配列がコードするアミノ酸配列を、配列番号: 14に示す。

20

25 Blast P [Nucleic Acids Res., 第25巻、3389頁、1997年] を用いてowlに対してホモロジー検索を行ったところ、ヒトTCH230タンパク質をコードするcDNAはナトリウム依存性胆汁酸トランスポータファミリーに属する新規遺伝子であることが判明した (図1)。ヒトで報告されている回腸ナトリウム依存性胆汁酸トランスポータであるISBT [J. Biol. Chem., 第270巻、27228頁、

1995年] とは塩基レベルで46%、アミノ酸レベルで44%の相同性を示した。

## 実施例 2

### ヒトTCH230遺伝子産物の組織分布の解析

- 5 ヒトTCH230の配列から設計した、2種のプライマーDNA、プライマーTF  
(配列番号: 15) およびプライマーTR (配列番号: 16) と、TaqManプローブ  
T1 (配列番号: 17) を用いて、ヒトの各組織のcDNAにおけるヒトTCH230  
の発現量をTaqMan PCRにより測定した。反応はTaqMan Universal PCR Master  
Mix (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて、ABI PRISM 7900 sequence  
10 detection system (アプライドバイオシステムズ社製) にて、最初50℃2分  
間、さらに95℃10分間おいた後で、95℃で15秒、60℃で1分を1反  
応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。測定に用いた  
ヒトの各組織のcDNAを〔表1〕に示す。

15 〔表1〕

cDNA (いずれもク ロンテック社製)	組 織
Human MTC panel I	心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓
Human MTC panel I I	脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、結腸、 末梢血白血球
Human digestive system MTC panel	肝臓、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、回盲部、 盲腸、上行結腸、横行結腸、下行結腸、直腸
Human fetal MTC panel	胎児脳、胎児肺、胎児肝臓、胎児腎臓、胎児心臓、 胎児骨格筋、胎児脾臓、胎児胸腺
Human tumor MTC panel	乳癌 (GI-101)、肺癌 (LX-1)、結腸癌 (CX-1)、 肺癌 (GI-117)、前立腺癌 (PC3)、結腸癌 (GI-112)、 卵巣癌 (GI-102)、脾臓癌 (GI-103)

結果を図2、図3、図4および図5に示す。

- 20 ヒトTCH230遺伝子産物 (mRNA) はHuman MTC panel IおよびMTC panel IIにお  
いては、心臓、脳、肝臓、骨格筋、腎臓、結腸、末梢血白血球でわずかな発現  
が見られ、胎盤、肺、脾臓、脾臓、胸腺、前立腺、小腸で若干の発現が見られ、  
精巣、卵巣で強い発現が見られた。Human digestive system MTC panelにおい

ては、胃から直腸まですべての部位で強い発現が見られた（食道で特に強い発現が見られた）。また、肝臓でも強い発現が見られた。Human fetal MTC panel においては、胎児心臓、胎児骨格筋、胎児脾臓でわずかな発現が見られ、胎児脳、胎児肝臓、胎児腎臓、胎児肺で若干の発現が見られ、胎児胸腺で強い発現が見られた。Human tumor MTC panelにおいては、肺癌、結腸癌、前立腺癌、膵臓癌でわずかな発現が見られ、乳癌で若干の発現が見られ、卵巣癌で強い発現が見られた。

### 実施例 3

- 10 ヒトTCH234タンパク質をコードするcDNAの5' 上流端のクローニング
- 5' RACE PCR クローニングによりヒトTCH234タンパク質をコードするcDNAの5' 上流塩基配列を明らかにした。
- 2種のプライマーDNA、プライマーAP 1（配列番号：20）およびプライマーrr 0（配列番号：21）を用いて、ヒト膵臓Marathon-Ready cDNA（クロンテック社製）に対して、Advantage 2 DNA Polymerase（クロンテック社製）により、以下の条件(1)～(3)で一次PCRを行った。
- 15 (1) 94℃ 30秒間  
(2) 94℃ 10秒間－68℃ 2分間を35サイクル  
(3) 68℃ 5分間
- 20 さらに、この一次PCRの産物を鋳型として、プライマーAP 2（配列番号：22）とプライマーrr 1（配列番号：23）を用いて、Advantage 2 DNA Polymerase（クロンテック社製）により以下の条件(4)～(6)でnested PCRを行った。
- (4) 94℃ 30秒間  
(5) 94℃ 10秒間－68℃ 2分間を30サイクル  
(6) 68℃ 5分間
- 25 上記nested PCR反応液 5  $\mu$  lにPCR Product Pre-Sequencing Kit（ユーエスピ社製）中のExonuclease IとShrimp Alkaline Phosphataseをいずれも1  $\mu$  lずつ加え、37℃・15分、85℃・15分の反応を行った。これをプライマ

ー r r 1 (配列番号 : 23) および BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit  
(アプライドバイオシステムズ社製) を用いて反応を行い、増幅した DNA 断  
片の塩基配列を DNA シークエンサー ABI PRISM 3100 DNA アナライザ (アプラ  
イドバイオシステムズ社製) を用いて決定した。その結果、配列番号 : 39 に示  
す塩基配列を得た。

#### 実施例 4

ヒト TCH234 タンパク質をコードする cDNA の 3' 下流端のクローニング

3' RACE PCR クローニングによりヒト TCH234 タンパク質をコードする cDN  
A の 3' 下塩基配列を明らかにした。

2 種のプライマー DNA、プライマー AP 1 (配列番号 : 20) およびプライ  
マー ff 1 (配列番号 : 24) を用いて、ヒト臍臓 Marathon-Ready cDNA (クロ  
ンテック社製) に対して、Advantage 2 DNA Polymerase (クロンテック社製) に  
より、以下の条件 (1) ~ (3) で一次 PCR を行った。

(1) 94℃ 30 秒間

(2) 94℃ 10 秒間 - 68℃ 2 分間を 35 サイクル

(3) 68℃ 5 分間

さらに、この一次 PCR の産物を鋳型として、プライマー AP 2 (配列番  
号 : 22) とプライマー ff 2 (配列番号 : 25) を用いて、Advantage 2 DNA  
Polymerase (クロンテック社製) により以下の条件 (4) ~ (6) で nested PCR を行  
った。

(4) 94℃ 30 秒間

(5) 94℃ 10 秒間 - 68℃ 2 分間を 30 サイクル

(6) 68℃ 5 分間

上記 nested PCR 反応液 5  $\mu$  l に PCR Product Pre-Sequencing Kit (ユーエ  
スビ社製) 中の Exonuclease I と Shrimp Alkaline Phosphatase をいずれも 1  $\mu$  l  
ずつ加え、37℃・15 分、85℃・15 分の反応を行った。これをプライマ  
ー ff 2 (配列番号 : 25) および BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit  
(アプライドバイオシステムズ社製) を用いて反応を行い、増幅した DNA 断

片の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて決定した。その結果、配列番号：40に示す塩基配列を得た。

## 5 実施例 5

ヒトTCH234タンパク質をコードするcDNAのクローニング

2種のプライマーDNA、プライマーORFF1（配列番号：26）およびプライマーORFR1（配列番号：27）を用いて、ヒト脾臓Marathon-Ready cDNA（クロンテック社製）に対して、pfu turbo DNA Polymerase（ストラタジーン社製）により、以下の条件(1)～(3)で一次PCRを行った。

(1) 94℃ 30秒間

(2) 94℃ 10秒間－54℃ 5秒間－72℃ 2.5分間を35サイクル

(3) 72℃ 5分間

さらに、この一次PCRの産物を鋳型として、プライマーORFF2（配列番号：28）とプライマーORFR2（配列番号：29）を用いて、pfu turbo DNA Polymerase（ストラタジーン社製）により以下の条件(4)～(6)でnested PCRを行った。

(4) 94℃ 30秒間

(5) 94℃ 10秒間－55℃ 5秒間－72℃ 2.5分間を30サイクル

(6) 72℃ 5分間

上記nested PCR反応液をQIAquick PCR Purification Kit（キアゲン社製）を用いて精製した。このDNAを、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit（インビトロジェン社製）のプロトコールに従ってpCR-Blunt II-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ（Escherichia coli）TOP10 competent cell（インビトロジェン社製）に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをカナマイシンを含むLB寒天培地で選択し、形質転換体を得た。個々のクローンをカナマイシンを含むLB培地で一晩培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit（キアゲン社製）を用いてプラスミドDNAを調製し、プラスミドクローンpCR-BluntII-TCH234の2クローン#1、#2および#3を得た。これ

をプライマーDNA〔プライマーM13F（配列番号：30）、プライマーM13R（配列番号：31）、プライマーORFF2（配列番号：28）、プライマーORFR2（配列番号：29）、プライマーTMF（配列番号：32）、プライマーTMR（配列番号：33）、プライマーF2（配列番号：34）、プライマーF3（配列番号：35）、プライマーR1（配列番号：36）、プライマーR2（配列番号：37）、プライマーff2（配列番号：25）〕およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて反応を行い、挿入されているcDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて決定した。

5      その結果、取得した3クローンは同一のDNA断片を含んでおり2426個の塩基配列を有していた（配列番号：41）。断片には798個のアミノ酸配列（配列番号：18）がコードされており（配列番号：19）、配列番号：18で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質を、ヒトTCH234タンパク質と命名した。

10      該cDNA断片を含むプラスミドを有する形質転換体を、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）TOP10/pCR-BluntII-TCH234と命名した。

15      Blast P〔*Nucleic Acids Res.*、第25巻、3389頁、1997年〕を用いてOWLに対してホモロジー検索を行ったところ、該cDNAは $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換輸送体に属する新規遺伝子であることが判明した（図6）。

20      ヒトTCH234は、ヒトで報告されている $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換輸送体であるNHE2〔*Genomics*、第30巻、25頁、1995年〕とはアミノ酸レベルで53%の相同性、またラットNHE4（*J. Biol. Chem.*、第267巻、9331頁、1992年）とはアミノ酸レベルで84%の相同性を示し、該タンパク質は13回膜貫通型の構造を有すると推測された。

## 25      実施例6

### ヒトTCH234遺伝子産物の組織分布の解析

ヒトTCH234の配列から設計した、2種のプライマーDNA、プライマーTMF（配列番号：32）およびプライマーTMR（配列番号：33）と、TaqManプローブP1（配列番号：38）を用いて、ヒトの各組織（心臓、脳、胎盤、



肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、結腸、末梢血白血球) の cDNA (Human MTC panel I、および Human MTC panel II: クロンテック社製) におけるヒト TCH234 の発現量を TaqMan PCR により測定した。反応は TaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system (アプライドバイオシステムズ社製) にて最初 50℃ 2 分間、さらに 95℃ 10 分間おいた後、95℃ で 15 秒、60℃ で 1 分を 1 反応サイクルとして 40 サイクル繰り返す、同時に検出を行った。

結果を図 7 に示す。ヒト TCH234 遺伝子産物 (mRNA) は腎臓に強く発現していた。前立腺や膵臓、精巣、脾臓、胸腺、卵巣でも若干の発現が認められた。

#### 実施例 7

##### ヒト TCH212 遺伝子 cDNA のクローニング

2 種のプライマー DNA、プライマー A 3 (配列番号: 44) およびプライマー OB 3 (配列番号: 45) を用いて、ヒト精巣 Marathon-Ready cDNA (クロンテック社製) に対して、Pyrobest DNA Polymerase (宝酒造社製) により、以下の条件 (1) ~ (3) で PCR を行った。

(1) 94℃ 2 分間

(2) 98℃ 10 秒間 - 68℃ 30 秒間 - 72℃ 7 分間を 35 サイクル

(3) 72℃ 10 分間

得られた増幅産物を Zero Blunt TOPO Cloning kit (インビトロジェン社製) を用いてクローニングし、プラスミド pCR-BluntII-TCH212 を得た。

これをプライマー DNA [プライマー SP 6 (配列番号: 46)、プライマー T 7 (配列番号: 47)、プライマー A 2 (配列番号: 48)、プライマー B 1 (配列番号: 49)、プライマー B 2 (配列番号: 50)、プライマー F 1 (配列番号: 51)、プライマー F 2 (配列番号: 52)、プライマー F 3 (配列番号: 53)、プライマー F 4 (配列番号: 54)、プライマー F 5 (配列番号: 55)、プライマー R 1 (配列番号: 56)、プライマー R 2 (配列番号: 57)、プライマー R 3 (配列番号: 58)、プライマー R 4 (配列番号: 59)] および BigDye

Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて反応を行い、挿入されている cDNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサー ABI PRISM 3100 DNA アナライザ (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて決定した。その結果、取得したクローンは 3643 個の塩基配列を有していた (配列番号: 60)。該 cDNA 断片には 1148 個のアミノ酸配列 (配列番号: 42) がコードされており (配列番号: 43)、該アミノ酸配列を有するタンパク質を、ヒト TCH212 タンパク質と命名した。

また、取得したクローンには、1 箇所 (配列番号: 60 で表される塩基配列の 1592 番目) に塩基置換が認められるものもあった (クローン #2 とする)。この塩基置換 C1592T は、アミノ酸置換を伴わないものであり、遺伝子多型 (SNPs) に由来すると考えられる。このクローンの有する cDNA 全長の塩基配列を配列番号: 61 に、この塩基配列中の ORF の塩基配列を配列番号: 62 に示す。

配列番号: 60 で表される塩基配列を含有する cDNA を含むプラスミドを有する形質転換体を、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109/pCR-BluntII-TCH212 と命名した。

Blast P [Nucleic Acids Res., 第25巻、3389頁、1997年] を用いて owl に対してホモロジー検索を行ったところ、ヒト TCH212 をコードする cDNA は P 型 ATPase ファミリーに属する新規遺伝子であることが判明した (図 8 ~ 図 10)。ヒトで報告されている P 型 ATPase 8A1 (ATP8A1) [Biochem. Biophys. Res. Commun., 第257巻、333-339頁、1999年] とは塩基レベルで 60%、アミノ酸レベルで 67% の相同性を示した。また、マウスで報告されている P 型 ATPase 8A2 [Physiol. Genomics (Online), 第1巻、139-150頁、1999年] とは塩基レベルで 86%、アミノ酸レベルで 95% の相同性を示した。

## 実施例 8

### ヒト TCH212 遺伝子産物の組織分布の解析

ヒト TCH212 の配列から設計した、2 種のプライマー DNA、プライマー TF (配列番号: 63) およびプライマー TR (配列番号: 64) と、TaqMan プローブ

T 1（配列番号：65）とを用いて、ヒトの各組織におけるヒトTCH212の発現量をTaqMan PCRにより測定した。反応はTaqMan Universal PCR Master Mix（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system（アプライドバイオシステムズ社製）にて、最初50℃2分間、さらに

5 95℃10分間おいた後で、95℃で15秒、60℃で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。測定に用いたヒトの各組織のcDNAを〔表2〕に示す。

〔表2〕

cDNA（いずれもク ロンテック社製）	組 織
Human MTC panel I	心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓
Human MTC panel I I	脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、結腸、 末梢血白血球
Human fetal MTC panel	胎児脳、胎児肺、胎児肝臓、胎児腎臓、胎児心臓、 胎児骨格筋、胎児脾臓、胎児胸腺
Human tumor MTC panel	乳癌(GI-101)、肺癌(LX-1)、結腸癌(CX-1)、 肺癌(GI-117)、前立腺癌(PC3)、結腸癌(GI-112)、 卵巣癌(GI-102)、脾臓癌(GI-103)

結果を図11、図12および図33に示す。

ヒトTCH212遺伝子産物(mRNA)は、Human MTC panel IおよびMTC panel IIにおいては、脳で若干の発現が見られ、脾臓、精巣で強い発現を示した。

Human fetal MTC panelにおいては、胎児腎臓で若干の発現が見られ、胎児脳

15 で強い発現が見られた。

Human tumor MTC panelにおいては、結腸癌(GI-112)でわずかな発現が見られた。

#### 実施例9

20 ヒトTCH200タンパク質をコードするcDNAの5'上流端のクローニング

5' RACE PCR クローニングによりヒトTCH200タンパク質をコードするcDNAの5'上流塩基配列を明らかにした。

ヒト小腸Marathon-Ready cDNA (クロンテック社製) を鋳型として、プライマーAP 1 (配列番号: 68) とプライマーR1 (配列番号: 69) を用いて、PCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型として、プライマーAP 2 (配列番号: 70) およびプライマーrr 2 (配列番号: 71) を用いてPCR反応を行った。PCRの反応液組成および反応条件を以下に示す。反応液はヒト小腸Marathon-Ready cDNA 2.5  $\mu$ l、プライマーAP 1 5  $\mu$ M、プライマーR1 5  $\mu$ M、dNTPs 0.4 mM、Advantage2 Polymerase mix (クロンテック社製) 0.5  $\mu$ l およびAdvantage2 Polymerase mixに添付のバッファー (クロンテック社製) で総反応量を25  $\mu$ l とし、サーマルサイクラー9700 (アプライドバイオシステムズ社製) を用い、94 $^{\circ}$ C・30秒の加熱の後、94 $^{\circ}$ C・5秒、68 $^{\circ}$ C・4分のサイクルを35回繰り返した。次に、Tricine-EDTA Bufferで50倍希釈した上記PCR反応液 (AP 1/R 1で反応) 2.5  $\mu$ l、プライマーAP 2 5  $\mu$ M、プライマーrr 2 5  $\mu$ M、dNTPs 0.4 mM、Advantage2 Polymerase mix (クロンテック社製) 0.5  $\mu$ l およびAdvantage2 Polymerase mixに添付のバッファー (クロンテック社製) で総反応量を25  $\mu$ l とし、サーマルサイクラー9700 (アプライドバイオシステムズ社製) を用い、94 $^{\circ}$ C・30秒の加熱の後、94 $^{\circ}$ C・5秒、68 $^{\circ}$ C・4分のサイクルを30回繰り返した。増幅したDNAを1.5%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約700塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社製) を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (インビトロジェン社製) のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (Escherichia coli) TOP10 competent cell (インビトロジェン社製) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地で選択し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン社製) を用いてプラスミドDNAを調製した。これをプライマーDNA [プライマーM13 F (配列番号: 72)、プライマーM13 R (配列番号: 73)、プライマーrr 2 (配列番号: 71)] およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社

製)を用いて反応を行い、挿入されているcDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて決定した。その結果、配列番号:97に示す塩基配列を得た。

次に配列番号:97で示した塩基配列をもとにプライマーrr4(配列番号:74)とプライマーrr6(配列番号:75)を設計した。更に上流の塩基配列を得るためにプライマーAP1(配列番号:68)とプライマーrr4(配列番号:74)を用いて、PCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型として、プライマーAP2(配列番号:70)およびプライマーrr6(配列番号:75)を用いてPCR反応を行なった。PCRの反応液組成および反応条件を以下に示す。反応液はヒト小腸Marathon-Ready cDNA 2.5  $\mu$ l、プライマーAP1 5  $\mu$ M、プライマーrr4 5  $\mu$ M、dNTPs 0.4 mM、Advantage2 Polymerase mix(クロンテック社製) 0.5  $\mu$ lおよびAdvantage2 Polymerase mixに添付のバッファー(クロンテック社製)で総反応量を25  $\mu$ lとし、サーマルサイクラー9700(アプライドバイオシステムズ社製)を用い、94 $^{\circ}$ C・30秒の加熱の後、94 $^{\circ}$ C・5秒、68 $^{\circ}$ C・1.5分のサイクルを35回繰り返した。次に、Tricine-EDTA Bufferで50倍希釈した上記PCR反応液(AP1/rr4で反応)2.5  $\mu$ l、プライマーAP2 0.5  $\mu$ M、プライマーrr6 0.5  $\mu$ M、dNTPs 0.4 mM、Advantage2 Polymerase mix(クロンテック社製) 0.5  $\mu$ lおよびAdvantage2 Polymerase mixに添付のバッファー(クロンテック社製)で総反応量を25  $\mu$ lとし、サーマルサイクラー9700(アプライドバイオシステムズ社製)を用い、94 $^{\circ}$ C・30秒の加熱の後、94 $^{\circ}$ C・5秒、68 $^{\circ}$ C・1.5分のサイクルを30回繰り返した。1.5%のアガロースゲル電気泳動により増幅した約280塩基長のDNAを確認した後、上記PCR反応液(AP2/rr6で反応)5  $\mu$ lにPCR Product Pre-Sequencing Kit(ユーエスビ社製)中のExonuclease IとShrimp Alkaline Phosphataseをいずれも1  $\mu$ lずつ加え、37 $^{\circ}$ C・15分、85 $^{\circ}$ C・15分の反応を行った。この反応液を超純水で3倍希釈し、これをプライマーrr6(配列番号:75)およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて反応を行い、増幅したDNA断片の塩基配列を

DNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて決定した。その結果、配列番号：98に示す塩基配列を得た。

## 5 実施例 10

ヒトTCH200タンパク質をコードするcDNAの3' 下流端のクローニング

3' 下流端のクローニングは、ヒト小腸Marathon-Ready cDNA（クロンテック社製）を鋳型として、プライマーAP 1（配列番号：68）およびプライマーr 1（配列番号：76）を用いてPCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型として、プライマーAP 2（配列番号：70）およびプライマーr 2（配列番号：77）を用いてPCR反応を行なった。PCRの反応液組成と反応条件を以下に示す。反応液はヒト小腸Marathon-Ready cDNA 2.5  $\mu$ l、プライマーAP 1 5  $\mu$ M、プライマーr 1 5  $\mu$ M、dNTPs 0.4 mM、Advantage2 Polymerase mix（クロンテック社製）0.5  $\mu$ lおよびAdvantage2 Polymerase mixに添付のバッファー（クロンテック社製）で総反応量を25  $\mu$ lとし、サーマルサイクラー9700（アプライドバイオシステムズ社製）を用い、94℃・30秒の加熱の後、94℃・5秒、68℃・4分のサイクルを35回繰り返した。次に、Tricine-EDTA Bufferで50倍希釈した上記PCR反応液（AP 1/r 1で反応）2.5  $\mu$ l、プライマーAP 2 5  $\mu$ M、プライマーr 2 5  $\mu$ M、dNTPs 0.4 mM、Advantage2 Polymerase mix（クロンテック社製）0.5  $\mu$ lおよびAdvantage2 Polymerase mixに添付のバッファー（クロンテック社製）で総反応量を25  $\mu$ lとし、サーマルサイクラー9700（アプライドバイオシステムズ社製）を用い、94℃・30秒の加熱の後、94℃・5秒、68℃・4分のサイクルを30回繰り返した。増幅したDNAを1.5%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約600塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン社製）を用いて回収した。このDNAを、TOP0 TA Cloning Kit（インビトロジェン社製）のプロトコールに従ってpCR2.1-TOP0ベクターへクローニングした。これをエシエリヒア コリ (Escherichia coli) TOP10 competent cell（インビトロジェン社

製)に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地で選択し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン社製)を用いてプラスミドDNAを調製した。これをプライマーDNA〔プライマーM13F (配列番号:72)、プライマーM13R (配列番号:73)、プライマーr2 (配列番号:77)〕およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて反応を行い、挿入されているcDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて決定した。その結果配列番号:99に示す塩基配列を得た。

更に3'下流端の塩基配列を得るためにヒト小腸Marathon-Ready cDNA (クロンテック社製)を鋳型として、プライマーAP1 (配列番号:68)およびプライマーf1 (配列番号:78)を用いてPCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型として、プライマーAP2 (配列番号:70)およびプライマーf2 (配列番号:79)を用いてPCR反応を行なった。PCRの反応液組成と反応条件を以下に示す。反応液はヒト小腸Marathon-Ready cDNA 2.5  $\mu$ l、プライマーAP1 5  $\mu$ M、プライマーf1 5  $\mu$ M、dNTPs 0.4 mM、Advantage2 Polymerase mix (クロンテック社製) 0.5  $\mu$ lおよびAdvantage2 Polymerase mixに添付のバッファー (クロンテック社製)で総反応量を25  $\mu$ lとし、サーマルサイクラー9700 (アプライドバイオシステムズ社製)を用い、94℃・30秒の加熱の後、94℃・5秒、68℃・1.5分のサイクルを35回繰り返した。次に、Tricine-EDTA Bufferで50倍希釈した上記PCR反応液 (AP1/f1で反応) 2.5  $\mu$ l、プライマーAP2 5  $\mu$ M、プライマーf2 5  $\mu$ M、dNTPs 0.4 mM、Advantage2 Polymerase mix (クロンテック社製) 0.5  $\mu$ lおよびAdvantage2 Polymerase mixに添付のバッファー (クロンテック社製)で総反応量を25  $\mu$ lとし、サーマルサイクラー9700 (アプライドバイオシステムズ社製)を用い、94℃・30秒の加熱の後、94℃・5秒、68℃・1.5分のサイクルを30回繰り返した。1.5%のアガロースゲル電気泳動により増幅した約300塩基長のDNAを確認した後、

上記PCR反応液（AP 2 / f 2 で反応）5  $\mu$  l にPCR Product Pre-Sequencing Kit（ユーエスビ社製）中のExonuclease I と Shrimp Alkaline Phosphatase をいずれも1  $\mu$  l ずつ加え、37℃・15分、85℃・15分の反応を行った。この反応液を超純水で3倍希釈し、これをプライマー f 2（配列番号：79）および

5 BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて反応を行い、増幅したDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて決定した。その結果、配列番号：100に示す塩基配列を得た。

次に配列番号：100で示した塩基配列をもとにプライマー f 4（配列番号：80）を設計した。更に下流の塩基配列を得るためにプライマーAP 1（配列番号：68）とプライマー f 2（配列番号：79）を用いて、一回目のPCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型として、プライマーAP 2（配列番号：70）およびプライマー f 4（配列番号：80）を用いて二回目のPCR反応を行った。PCRの反応液組成および反応条件を以下に示す。反応液はヒト精巢

10 Marathon-Ready cDNA 2.5  $\mu$  l、プライマーAP 1 5  $\mu$  M、プライマー f 2 5  $\mu$  M、dNTPs 0.4 mM、Advantage2 Polymerase mix（クロンテック社製）0.5  $\mu$  l およびAdvantage2 Polymerase mixに添付のバッファー（クロンテック社製）で総反応量を25  $\mu$  l とし、サーマルサイクラー9700（アプライドバイオシステムズ社製）を用い、94℃・30秒の加熱の後、94℃・

15 5秒、68℃・1.5分のサイクルを35回繰り返した。次に、Tricine-EDTA Bufferで50倍希釈した上記PCR反応液（AP 1 / f 2 で反応）2.5  $\mu$  l、プライマーAP 2 5  $\mu$  M、プライマー f 4 5  $\mu$  M、dNTPs 0.4 mM、Advantage2 Polymerase mix（クロンテック社製）0.5  $\mu$  l およびAdvantage2 Polymerase mixに添付のバッファー（クロンテック社製）で総反応量を25  $\mu$  l とし、サーマルサイクラー9700（アプライドバイオシステムズ社製）を用い、94℃・30秒の加熱の後、94℃・5秒、68℃・1.5分のサイクルを30回繰り返した。1.5%のアガロースゲル電気泳動により増幅した約

20 150塩基長のDNAを確認した後、上記PCR反応液（AP 2 / f 4 で反応）5  $\mu$  l にPCR Product Pre-Sequencing Kit（ユーエスビ社製）中の



Exonuclease I と Shrimp Alkaline Phosphatase をいずれも  $1 \mu\text{l}$  ずつ加え、 $37^\circ\text{C} \cdot 15$  分、 $85^\circ\text{C} \cdot 15$  分の反応を行った。この反応液を超純水で 3 倍希釈し、これをプライマー DNA [プライマー AP 2 (配列番号：70)、プライマー f 4 (配列番号：80)] および BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて反応を行い、増幅した DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサー ABI PRISM 3100 DNA アナライザ (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて決定した。その結果、配列番号：101 に示す塩基配列を得た。

## 10 実施例 11

ヒト TCH200 タンパク質をコードする cDNA のクローニング

ヒト TCH200 タンパク質をコードする cDNA のクローニングは、Nested PCR 法により行った。

ヒト TCH200 タンパク質をコードする cDNA のクローニングのために実施例 1 および実施例 2 で得た塩基配列 (配列番号：97, 配列番号：98, 配列番号：99, 配列番号：100, 配列番号：101) をもとに、プライマー F 0 (配列番号：81) およびプライマー R 7 (配列番号：82) およびプライマー F 0 0 (配列番号：83) およびプライマー R 0 0 (配列番号：84) を設計した。一回目の PCR 反応は、ヒト小腸 Marathon-Ready cDNA (クロンテック社製) を鋳型とし、プライマー F 0 およびプライマー R 7 を用いて行った。次にこの PCR 反応液を鋳型とし、プライマー F 0 0 およびプライマー R 0 0 を用いて 2 回目の PCR 反応を行なった。PCR の反応液組成および反応条件を以下に示す。反応液はヒト小腸 Marathon-Ready cDNA  $2.0 \mu\text{l}$ 、プライマー F 0  $12.5 \mu\text{M}$ 、プライマー R 7  $12.5 \mu\text{M}$ 、dNTPs  $0.4 \text{mM}$ 、pfu turbo DNA Polymerase (ストラタジーン社製)  $0.5 \mu\text{l}$  および Advantage2 Polymerase mix に添付のバッファー (クロンテック社製) で総反応量を  $20 \mu\text{l}$  とし、サーマルサイクラー 9700 (アプライドバイオシステムズ社製) を用い、 $94^\circ\text{C} \cdot 30$  秒の加熱の後、 $94^\circ\text{C} \cdot 10$  秒、 $56^\circ\text{C} \cdot 5$  秒、 $72^\circ\text{C} \cdot 2.5$  分のサイクルを 35 回繰り返した。次にこの PCR 反応液 (F 0/R 7 で反応)  $1 \mu$

1、プライマーF 0 0 1 2. 5  $\mu$ M、プライマーR 0 0 1 2. 5  $\mu$ M、d  
NTPs 0. 4mM、pfu turbo DNA Polymerase (ストラタジーン社製) 0.  
5  $\mu$ l および Advantage2 Polymerase mix に添付のバッファー (クロンテック社  
5 製) で総反応量を 20  $\mu$ l とし、サーマルサイクラー 9700 (アプライドバ  
イオシステムズ社製) を用い、94℃・30秒の加熱の後、94℃・10秒、  
56℃・5秒、72℃・2. 5分のサイクルを30回繰り返した。増幅したD  
NAを1. 5%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、2376塩基長  
のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キア  
10 ゲン社製) を用いて回収した。このDNAを、Zero Blunt TOP0 PCR Cloning  
Kit (インビトロジェン社製) のプロトコールに従ってpCR-Blunt II-TOP0ベクタ  
ーへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (Escherichia coli) TOP10  
competent cell (インビトロジェン社製) に導入して形質転換した後、cDN  
A挿入断片を持つクローンをカナマイシンを含むLB寒天培地で選択し、形質  
転換体を得た。個々のクローンをカナマイシンを含むLB培地で一晚培養し、  
15 QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン社製) を用いてプラスミドDNAを調製し、  
プラスミドクローンpCR-BluntII-TCH200の2クローン#1、#2および#3を  
得た。これをプライマーDNA [プライマーM13F (配列番号: 72)、プラ  
イマーM13R (配列番号: 73)、プライマーF 0 0 (配列番号: 83)、プラ  
イマーR 0 0 (配列番号: 84)、プライマーF 1 (配列番号: 85)、プライマ  
20 ーF 2 (配列番号: 86)、プライマーF 5 (配列番号: 87)、プライマーF 7  
(配列番号: 88)、プライマーR 1 (配列番号: 69)、プライマーf f 3 (配  
列番号: 89)、プライマーf f 4 (配列番号: 90)、プライマーf 2 (配列番  
号: 80)、プライマーf 3 (配列番号: 91)、プライマーr r 1 (配列番号:  
92)、プライマーr r 2 (配列番号: 71)、プライマーr r 3 (配列番号:  
25 93)] およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシ  
ステムズ社製) を用いて反応を行い、挿入されているcDNA断片の塩基配列  
をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ (アプライドバイオシ  
ステムズ社製) を用いて決定した。その結果、取得した2クローンは同一のD  
NA断片を含んでおり2376個の塩基配列を有していた (配列番号: 102)。

断片には791個のアミノ酸配列（配列番号：66）がコードされており（配列番号：97）、配列番号：66で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質を、ヒトTCH200タンパク質と命名した。

該cDNA断片（配列番号：102）を含むプラスミドを有する形質転換体を、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）TOP10/pCR-BluntII-TCH200と命名した。

この取得した配列（配列番号：102）を公共のゲノムデータベースに対してホモロジー検索を行ったところ、1箇所（配列番号：67で表される塩基配列の558番目のCがAに置換）に塩基置換が認められた（配列番号：103）。この塩基置換C558Aは、アミノ酸置換を伴わないものであり、遺伝子多型（SNPs）に由来する可能性があると考えられる。

Blast P [Nucleic Acids Res., 第25巻、3389頁、1997年] を用いてGENEMBLに対してホモロジー検索を行ったところ、配列番号：67で表される塩基配列を含有するcDNAはヒトバニロイドレセプターに属する新規遺伝子であることが判明した（図13）。ヒトで報告されているバニロイド受容体あるHumanVR1 [Biochemical and Biophysical Research Communications, 281巻、1183頁、2001年] とは塩基レベルで58%、アミノ酸レベルで43%の相同性を示し、ヒトTCH200タンパク質は6回膜貫通型の構造を有すると推測された。

## 実施例12

### ヒトTCH200遺伝子産物の組織分布の解析

ヒトTCH200の配列から設計した、2種のプライマーDNA、プライマーTMF（配列番号：94）およびプライマーTMR（配列番号：95）と、TaqManプローブP1（配列番号：96）を用いて、ヒトの各組織（心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸、末梢血白血球）のcDNA（Human MTC panel I、およびHuman MTC panel II：クロンテック社製）におけるヒトTCH200の発現量をTaqMan PCRにより測定した。反応はTaqMan Universal PCR Master Mix（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system（アプ

ライドバイオシステムズ社製)にて最初50℃2分間、さらに95℃10分間おいた後で、95℃で15秒、60℃で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。

5 結果を図14に示す。ヒトTCH200遺伝子産物(mRNA)は広い組織で発現が認められたが、なかでも胸腺、精巣、卵巣、小腸、結腸で比較的強い発現を示したが、胎盤ではほとんど認められなかった。

### 実施例13

マウスTCH230タンパク質をコードするcDNAのクローニング

10 2種のプライマーDNA、プライマーm230A1(配列番号:106)およびプライマーm230B2(配列番号:107)を用いて、マウス精巣Marathon-Ready cDNA(クロンテック社製)に対して、Pyrobest DNA Polymerase(タカラバイオ社製)により、以下の条件(1)~(3)でPCRを行った。

- 15 (1) 94℃2分間  
(2) 98℃10秒間-72℃2分間を30サイクル  
(3) 72℃10分間

得られた増幅産物をZero Blunt TOP0 Cloning kit(インビトロジェン社製)を用いてクローニングし、プラスミドpCR-BluntII-mTCH230を得た。

20 これをプライマーDNA〔プライマーSP6(配列番号:7)、プライマーT7(配列番号:8)、プライマーm230F1(配列番号:108)、プライマーm230F2(配列番号:109)、プライマーm230R1(配列番号:110)、プライマーm230R2(配列番号:111)〕およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて反応を行い、挿入されているcDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて決定した。その結果、クローンは1237個の塩基配列を有していた(配列番号:112)。該cDNA断片には373個のアミノ酸配列(配列番号:104)がコードされており(配列番号:105)、該アミノ酸配列を有するタンパク質を、マウスTCH230タンパク質と命名した。

25 該cDNA断片を含むプラスミドを有する形質転換体を、エシェリヒア コ

リ (*Escherichia coli*) TOP10/pCR-BluntII-mTCH230と命名した。

マウスTCH230はヒトTCH230と塩基レベルで74%、アミノ酸レベルで70%の相同性を示し、マウスTCH230がヒトTCH230のマウスオルソログであることが判明した。(図15)

5

#### 実施例14

##### マウスTCH230遺伝子産物の組織分布の解析

マウスTCH230の配列から設計した、2種のプライマーDNA、プライマーm230TF (配列番号: 113) およびプライマーm230TR (配列番号: 114) と、  
10 TaqManプローブm230T1 (配列番号: 115) を用いて、マウスの各組織 (骨髄、目、リンパ節、平滑筋、前立腺、胸腺、胃、子宮、心臓、脳、脾臓、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、精巣、胚 (7日)、胚 (11日)、胚 (15日)、胚 (17日)) のcDNA (Mouse MTC panel IおよびMouse MTC panel II: クロンテック社製) におけるマウスTCH230の発現量を、TaqMan PCRにより測定した。反応はTaqMan  
15 Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system (アプライドバイオシステムズ社製) にて、最初50℃2分間、さらに95℃10分間おいた後で、95℃で15秒、60℃で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。

20 結果を図16に示す。

マウスTCH230遺伝子産物 (mRNA) は、Mouse MTC panel IおよびMTC panel II においては、目、リンパ節、前立腺、胸腺、子宮、脾臓、肝臓、腎臓、胚 (15日) で僅かな発現が見られ、胃、骨格筋、精巣、胚 (7日)、胚 (17日) で若干の発現が見られ、心臓で強い発現が見られ、肺で最も強い発現が見られた。

25

#### 実施例15

##### マウスTCH230遺伝子産物の7週齢BALB/cマウスにおける組織分布の解析

##### (1) 正常マウス各組織のcDNAの調製

7週齢BALB/cマウスの各組織 [脳、小脳、海馬、延髄、脊髄、坐骨神経、皮

膚、骨格筋、眼球、心臓、肺、気管、脾臓、腎臓、肝臓、前胃、後胃、十二指腸、空回腸、盲腸、結腸、直腸、脾臓、胸腺、骨髄、卵巢、子宮、前立腺、精巢（卵巢および子宮は雌から、それ以外は雄から、各1-10匹分を採取）]より、ISOGEN（ニッポンジーン社製）、またはRNeasy Mini Kit（キアゲン社製）を用いてtotal RNAを調製した。調製したtotal RNA に対してTaqMan Reverse Transcription Reagents（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて逆転写反応を行いcDNAを調製した。

## （2）マウスTCH230遺伝子産物の組織分布の解析

実施例14で用いた2種のプライマーDNA、プライマーm230TF（配列番号：113）およびプライマーm230TR（配列番号：114）と、TaqManプローブm230T1（配列番号：115）を用いて、上記のマウス各組織のcDNAにおけるマウスTCH230の発現量（コピー数）をTaqMan PCRにより測定した。同じcDNAについてTaqMan rodent GAPDH control reagents（アプライドバイオシステムズ社製）を用いてrodent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）の発現量（コピー数）も測定した。反応はTaqMan Universal PCR Master Mix（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system（アプライドバイオシステムズ社製）にて最初50℃2分間、さらに95℃10分間おいた後で、95℃で15秒、60℃で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。

結果を図17に示す。

マウスTCH230遺伝子産物（mRNA）は7週齢BALB/cマウスの各組織においては、卵巢、空回腸、盲腸、結腸、直腸、前立腺、脾臓、眼球、後胃、脾臓、心臓で僅かな発現が見られ、坐骨神経、気管、精巢、子宮で若干の発現が見られ、皮膚、肺で高い発現が見られ、前胃で最も高い発現が見られた。

## 実施例16

### ラットTCH230遺伝子の部分配列の同定

2種のプライマーDNA、プライマーr2300F（配列番号：117）およびプライマーr2300R（配列番号：118）を用いて、ラット精巢Marathon-Ready cDNA（ク

ロンテック社製) に対して、Advantage 2 DNA Polymerase (クロンテック社製) により、以下の条件(1)~(3)でPCRを行った。

(1) 95℃ 1分間

(2) 95℃ 30秒間 - 68℃ 3分間を35サイクル

5 (3) 68℃ 3分間

得られた増幅産物をゲル電気泳動後、約1.0kbの断片を切り出し、

QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社製) を用いて精製し、これをプライマーr2300F (配列番号: 117)、プライマーr2300R (配列番号: 118) および BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて反応を行い、PCR増幅産物の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて決定した。その結果、配列番号: 116で表される1046個の塩基配列を有するラット TCH230遺伝子cDNAの部分配列を同定した。

10

## 15 実施例 17

### (1) 正常ラット各組織のcDNAの調製

12週齢Wistarラット雄の各組織 (大脳、小脳、肝臓、腎臓、前立腺、心臓、肺、十二指腸、空回腸、結腸、皮膚、眼球) より、RNeasy Mini Kit (キアゲン社製) を用いてtotal RNAを調製した。調製したtotal RNA に対してTaqMan Reverse Transcription Reagents (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて逆転写反応を行いcDNAを調製した。

20

### (2) ラットTCH230遺伝子産物の組織分布の解析

配列番号: 116の配列から設計した、2種のプライマーDNA、プライマー r230TF (配列番号: 119) およびプライマーr230TR (配列番号: 120) と、 TaqManプローブr230T1 (配列番号: 121) を用いて、上記のラット各組織のcDNA におけるラットTCH230の発現量 (コピー数) をTaqMan PCRにより測定した。同じcDNAについてTaqMan rodent GAPDH control reagents (アプライドバイオシステムズ社製) を用いてrodent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現量 (コピー数) も測定した。反応はTaqMan Universal PCR

25

Master Mix (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system (アプライドバイオシステムズ社製) にて最初50℃ 2分間、さらに95℃10分間おいた後で、95℃で15秒、60℃で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。

5 結果を図18に示す。

ラットTCH230遺伝子産物 (mRNA) は12週齢Wistarラットの組織においては、全ての組織で発現が見られたが、中でも、大脳、前立腺、空回腸、結腸、皮膚などで高い発現が見られ、肺で最も高い発現が見られた。

## 10 実施例18

### ヒトTCH230発現ベクターの構築

ヒトTCH230 (配列番号: 1) 発現ベクターを、以下の方法により作成した。

実施例1により得られたプラスミド10ngを鋳型として、プライマー2300F2 (配列番号: 122) およびプライマー2300R2 (配列番号: 123) を用いて、

15 Pyrobest DNA Polymerase (タカラバイオ社製) により以下の条件 (1) ~ (3) でPCRを行った。5'末端側プライマー2300F2および3'末端側プライマー2300R2は、ベクターへのクローニングのために5'末端側にそれぞれHind IIIサイトおよびXba Iサイトを付加するように設計した。

(1) 94℃ 2分間

20 (2) 98℃ 10秒間 - 65℃ 30秒間 - 72℃ 3.5分間を30サイクル

(3) 72℃ 10分間

上記PCR反応液をゲル電気泳動後、主要バンドを精製した。これにより得られたPCR断片を、制限酵素Hind IIIおよびXba Iを用いて、37℃で1時間保温することにより消化し、この反応液をゲル電気泳動後、精製した。これを、動物

25 細胞発現ベクターであるpcDNA3.1(+) (インビトロジェン社製) のHind IIIサイトおよびXba Iサイトに、Takara ligation kit ver.2 (タカラバイオ社製) を用いてライゲーションした。このライゲーション反応液をエタノール沈殿処理後、コンピテント細胞である大腸菌 (Escherichia coli) TOP10 (インビトロジェン社製) に形質転換した。これにより得られた複数のコロニーからプラス



ミドを調製し、この塩基配列をプライマーDNA〔プライマーBGH RV（配列番号：124）、プライマーT7（配列番号：8）、プライマーB1（配列番号：9）、プライマーF1（配列番号：10）〕、およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて反応を行い、塩

5 基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて確認した。このプラスミドを有する形質転換体を、*Escherichia coli* TOP10/pCDNA3.1(+)-TCH230と命名した。

### 実施例 19

#### 10 ヒトTCH230発現CHO細胞株の作製および導入遺伝子発現量の測定

*Escherichia coli* TOP10/pCDNA3.1(+)-TCH230を培養し、この大腸菌体から EndoFree Plasmid Maxi Kit（キアゲン社製）を用いてプラスミドDNAを調製した。このプラスミドDNAをFuGENE 6 Transfection Reagent（ロシュ社製）を用いて添付のプロトコールに従ってCHO dhfr<sup>-</sup>細胞に導入した。2  $\mu$ gのプラスミド

15 DNAとトランスフェクション試薬との混合液を、24時間前に3 $\times$ 10<sup>5</sup>個のCHO dhfr<sup>-</sup>細胞を播種した直径6 cmシャーレに添加した。10%ウシ胎児血清（JRHバイオサイエンス社製）を含むMEM  $\alpha$  培地（インビトロジェン社製）で1日間培養した後、トリプシン処理により細胞をはがし、回収した細胞を1 wellあたり10-50個で96 well plateに播種した。さらに24時間後、培地に0.5mg/mlのジェネティシン

20 （インビトロジェン社製）を添加し、その後7日間0.5-1.0mg/mlのジェネティシンを含んだ培地中でTCH230発現細胞を選択した。1 wellあたり1-3コロニーの増殖が見られた22 wellについて、6 well plateに培養し、増殖した細胞から RNeasy Mini KitまたはRNeasy 96 Kit（ともにキアゲン社製）を用いてtotal RNAを調製した。調製したtotal RNA に対してTaqMan Reverse Transcription

25 Reagents（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて逆転写反応を行いcDNAを調製した。これについて、実施例2で用いたプライマーTF（配列番号：15）およびプライマーTR（配列番号：16）と、TaqManプローブT1（配列番号：17）とを用いて、TCH230の発現量をTaqMan PCRにより測定した。反応は TaqMan Universal PCR Master Mix（アプライドバイオシステムズ社製）を用い

て、ABI PRISM 7900 sequence detection system (アプライドバイオシステムズ社製) にて、最初 50℃ 2 分間、さらに 95℃ 10 分間おいた後で、95℃ で 15 秒、60℃ で 1 分を 1 反応サイクルとして 40 サイクル繰り返し、同時に検出を行った。ヒト TCH230 遺伝子高発現細胞株 (ポリクローナル) として、  
5 クローン No. 19 および No. 26 を選択した。これらを 1 well あたり 0.5 個で 96 well plate に播種し、ジェネティシン含有培地中で 7-10 日間培養し、モノクローナルなクローンを得た。これについて、total RNA を調製し、ヒト TCH230 遺伝子の発現量を TaqMan PCR により測定した。ヒト TCH230 遺伝子高発現細胞株 (モノクローナル) として、クローン No. 19-6 を選択した。

10

## 実施例 20

ヒト TCH230 発現 CHO 細胞株における [6, 7-<sup>3</sup>H(N)]-Estrone sulfate および [1, 2, 6, 7-<sup>3</sup>H(N)]-Dehydroepiandrosterone Sulfate 取り込みの測定

実施例 19 で取得したヒト TCH230 発現 CHO 細胞株 クローン No. 19-6 を用いて、  
15 [6, 7-<sup>3</sup>H(N)]-Estrone sulfate および [1, 2, 6, 7-<sup>3</sup>H(N)]-Dehydroepiandrosterone Sulfate (以下、[1, 2, 6, 7-<sup>3</sup>H(N)]-DHEA-S と称することもある) 取り込みを測定した。

ヒト TCH230 発現 CHO 細胞株 クローン No. 19-6 を、96 well plate に 1 well あたり  $4 \times 10^4$  個播種し、5mM sodium butyrate を含む MEM  $\alpha$  培地 (インビトロジェン社製) で、37℃ で 24 時間培養した。培地を除き、150  $\mu$ L NMDG バッファー (140mM N-メチル-D(-)-グルカミン、5.4mM KCl、0.34mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.44mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.26mM CaCl<sub>2</sub>、0.41mM MgSO<sub>4</sub>、0.49mM MgCl<sub>2</sub>、5.55mM Glucose、pH 7.4-7.6) で 3 回洗い、150  $\mu$ L NMDG バッファー を入れ 37℃ で 1 時間培養した。バッファーを 90  $\mu$ L NaCl バッファー (140mM NaCl、5.4mM KCl、0.34mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.44mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.26mM CaCl<sub>2</sub>、0.41mM MgSO<sub>4</sub>、0.49mM MgCl<sub>2</sub>、5.55mM Glucose、pH 7.4-7.6) または 90  $\mu$ L NMDG バッファー に置換したのち、2.5  $\mu$ M Estrone sulfate, ammonium salt, [6, 7-<sup>3</sup>H(N)]-もしくは 1.37  $\mu$ M Dehydroepiandrosterone Sulfate, sodium salt, [1, 2, 6, 7-<sup>3</sup>H(N)]- (いずれもパーキンエルマー・ライフサイエンス社製) を 10  $\mu$ L 加えた。これを 37℃ で 1 時

間培養したのち、バッファーを除去し、200  $\mu$ L PBS (タカラバイオ社製) で3回洗い、0.1N NaOHを10  $\mu$ L加え細胞を溶解した。100  $\mu$ L SuperMixシンチレータ (パーキンエルマー・ライフサイエンス社製) を加え、攪拌したのち、細胞に取り込まれた[6, 7- $^3$ H(N)]-Estrone sulfateもしくは[1, 2, 6, 7- $^3$ H(N)]-DHEA-S量を放射活性により測定した。測定は、1450 MICROBETA PLUS LIQUID SCINTILLATION COUNTER (パーキンエルマー・ライフサイエンス社製) により行った。同様の操作を、CHO dhfr-細胞にベクターpcDNA3.1(+)を導入した細胞(以下、Mockと称することもある) においても行い、放射活性を測定した。

結果を、[6, 7- $^3$ H(N)]-Estrone sulfateについては図19に、[1, 2, 6, 7- $^3$ H(N)]-DHEA-Sについては図20にそれぞれ示す。

これより、ヒトTCH230発現CHO細胞は、140mM NaCl存在下で[6, 7- $^3$ H(N)]-Estrone sulfateおよび[1, 2, 6, 7- $^3$ H(N)]-DHEA-Sを取り込むことが明らかとなった。

## 実施例21

### マウスTCH234遺伝子の部分配列の同定

2種のプライマーDNA、プライマーm234-1485F (配列番号: 126) およびプライマーm234-1801R (配列番号: 127) を用いて、マウス精巣Marathon-Ready cDNA (クロンテック社製) に対して、Advantage 2 DNA Polymerase (クロンテック社製) により、以下の条件(1)~(5)でPCRを行った。

(1) 94 $^{\circ}$ C 30秒間

(2) 94 $^{\circ}$ C 10秒間-62 $^{\circ}$ C 10秒間-68 $^{\circ}$ C 30秒間を35サイクル

(3) 68 $^{\circ}$ C 3分間

得られた増幅産物をゲル電気泳動後、約0.3kbの断片を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社製) を用いて精製し、これをプライマーm234-1485F (配列番号: 126) 、プライマーm234-1801R (配列番号: 127) およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて反応を行い、PCR増幅産物の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて決定

した。

その結果、配列番号：125で表される317個の塩基配列を有するマウスTCH234遺伝子cDNAの部分配列を同定した。

## 5 実施例 2 2

マウスTCH234遺伝子産物の組織分布の解析

配列番号：125で表される塩基配列から設計した、2種のプライマーDNA、プライマーm234-TMF（配列番号：128）およびプライマーm234-TMR（配列番号：129）と、TaqManプローブm234T1（配列番号：130）を用いて、実施例 1 5で調製したマウス各組織のcDNAにおけるマウスTCH234の発現量（コピー数）を TaqMan PCRにより測定した。同じcDNAについてTaqMan rodent GAPDH control reagents（アプライドバイオシステムズ社製）を用いてrodent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）の発現量（コピー数）も測定した。反応はTaqMan Universal PCR Master Mix（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system（アプライドバイオシステムズ社製）にて最初50℃2分間、さらに95℃10分間おいた後で、95℃で15秒、60℃で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。

結果を図 2 1 に示す。

マウスTCH234遺伝子産物（mRNA）は7週齢BALB/cマウスの各組織においては、坐骨神経、卵巣、皮膚、空回腸、結腸、前胃、前立腺、腎臓、子宮、胸腺、大脳で僅かな発現が見られ、肺、海馬、十二指腸、精巣、気管で若干の発現が見られ、後胃で特に高い発現が見られた。

## 25 実施例 2 3

ラットTCH234遺伝子の部分配列の同定

2種のプライマーDNA、プライマーr234-815F（配列番号：132）およびプライマーr234-1177R（配列番号：133）を用いて、ラット腎臓Marathon-Ready cDNA（クロンテック社製）に対して、Advantage 2 DNA Polymerase（クロンテ

ック社製)により、以下の条件(1)～(3)でPCRを行った。

(1) 94℃30秒間

(2) 94℃10秒間－62℃10秒間－68℃30秒間を35サイクル

(3) 68℃3分間

- 5 得られた増幅産物をゲル電気泳動後、約0.35 kbの断片を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社製)を用いて精製し、これをプライマーr234-815F (配列番号:132)、プライマーr234-1177R (配列番号:133)およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて反応を行い、PCR増幅産物の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて決定
- 10 した。その結果、配列番号:131で表される363個の塩基配列を有するラットTCH234遺伝子cDNAの部分配列を同定した。

#### 実施例24

- 15 ラットTCH234遺伝子産物の組織分布の解析

- 配列番号:131で表される塩基配列から設計した、2種のプライマーDNA、プライマーr234-TMF (配列番号:134)およびプライマーr234-TMR (配列番号:135)と、TaqManプローブr234-P1 (配列番号:136)を用いて、実施例17で調製したラット各組織のcDNAにおけるラットTCH234の発現量(コピー数)をTaqMan
- 20 PCRにより測定した。同じcDNAについてTaqMan rodent GAPDH control reagents (アプライドバイオシステムズ社製)を用いてrodent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)の発現量(コピー数)も測定した。反応はTaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system (アプライドバイオシステムズ社製)にて最初50℃2分間、さらに95℃10分間おいた後で、95℃で15秒、60℃
- 25 で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。

結果を図22に示す。

ラットTCH234遺伝子産物(mRNA)は12週齢Wistarラットの各組織においては、小脳、肝臓、空回腸、結腸で若干の発現が見られ、大脳、十二指腸、眼で高い

発現が見られ、腎臓で最も高い発現が見られた。

## 実施例 2 5

### ヒトTCH234発現ベクターの構築

5 ヒトTCH234（配列番号：18）発現ベクターを、以下の方法により作成した。

実施例 5 により得られたプラスミド10ngを鋳型として、プライマー2340F（配列番号：137）およびプライマー2340R（配列番号：138）を用いて、Pyrobest DNA Polymerase（タカラバイオ社製）により以下の条件（1）～（3）でPCRを行った。5'末端側プライマー2340Fおよび3'末端側プライマー2340Rは、ベ  
10 クターへのクローニングのために5'末端側にそれぞれHind IIIサイトおよびXba Iサイトを付加するように設計した。

（1）94℃1分間

（2）94℃30秒間－55℃30秒間－72℃3分間を25サイクル

（3）72℃5分間

15 上記PCR反応液をゲル電気泳動後、主要バンドを精製した。これにより得られたPCR断片を、制限酵素Hind IIIおよびXba Iを用いて、37℃で1時間保温することにより消化し、この反応液をゲル電気泳動後、精製した。これを、動物細胞発現ベクターであるpcDNA3.1(+)（インビトロジェン社製）のHind IIIサイトおよびXba Iサイトに、Takara ligation kit ver.2（タカラバイオ社製）を用いてライゲーションした。このライゲーション反応液を、コンピーテント細胞である大腸菌（*Escherichia coli*）JM109（タカラバイオ社製）に形質転換した。

これにより得られた複数のコロニーからプラスミドを調製し、この塩基配列をプライマーDNA〔プライマーBGH RV（配列番号：124）、プライマーT7  
25 （配列番号：8）、プライマーF3（配列番号：35）、プライマーR2（配列番号：37）、プライマーff2（配列番号：25）、プライマー234F21（配列番号：139）、プライマー234F22（配列番号：140）、プライマー234F23（配列番号：141）、プライマー234R24（配列番号：142）〕、およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて反応を行い、塩

基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて確認した。このプラスミドを有する形質転換体を、*Escherichia coli* JM109/pCDNA3.1(+)-TCH234と命名した。

## 5 実施例 2 6

### ヒトTCH234発現CHO細胞株の作製

*Escherichia coli* JM109/pCDNA3.1(+)-TCH234を培養し、この大腸菌体から EndoFree Plasmid Maxi Kit（キアゲン社製）を用いてプラスミドDNAを調製した。このプラスミドDNAをFuGENE 6 Transfection Reagent（ロシュ社製）を用いて添付のプロトコールに従ってCHO dhfr<sup>-</sup>細胞に導入した。2  $\mu$ gのプラスミド DNAとトランスフェクション試薬との混合液を24時間前に $3 \times 10^5$ 個のCHO dhfr<sup>-</sup>細胞を播種した直径6cmシャーレに添加した。10%ウシ胎児血清（JRHバイオサイエンス社製）を含むMEM  $\alpha$  培地（インビトロジェン社製）で1日間培養した後、トリプシン処理により細胞をはがし、回収した細胞を適宜希釈して10cmシャーレに播種した。さらに24時間後、培地に0.5mg/mlのジェネティシン（インビトロジェン社製）を添加し、その後10日間0.5-1.0mg/mlのジェネティシンを含んだMEM  $\alpha$  培地中でヒトTCH234発現細胞を選択した。ジェネティシン含有選択培地中に増殖してくるモノクローナルなヒトTCH234発現細胞のコロニーを104個選択した。

## 20 実施例 2 7

TaqMan PCR法を用いたヒトTCH234発現CHO細胞株における導入遺伝子発現量の測定

実施例26で作製したヒトTCH234発現CHO細胞株を96well plateに培養し、増殖した細胞からSV 96 Total RNA Isolation System（プロメガ社製）を用いて total RNAを調製した。調製したtotal RNA に対してTaqMan Reverse Transcription Reagents（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて逆転写反応を行いcDNAを調製した。これについて、実施例6で用いられたプライマー TMF（配列番号：32）およびプライマーTMR（配列番号：33）と、TaqManプローブP1（配列番号：38）とを用いて、ヒトTCH234の発現量をTaqMan PCRにより測

定した。反応はTaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system (アプライドバイオシステムズ社製) にて、最初 50℃ 2 分間、さらに 95℃ 10 分間おいた後で、95℃ で 15 秒、60℃ で 1 分を 1 反応サイクルとして 40 サイクル繰り返す、同時に検出を行った。ヒトTCH234遺伝子高発現細胞株として、クローンNo. 104を選択した。

## 実施例 28

ヒトTCH234遺伝子産物のヒト消化管組織における組織分布の解析

実施例 6 で用いた、プライマーTMF (配列番号: 32) およびプライマーTMR (配列番号: 33) およびTaqManプローブP1 (配列番号: 38) を用いて、ヒトの消化管各組織 (肝臓、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、回盲部、盲腸、上行結腸、横行結腸、下行結腸、直腸) のcDNA (Human digestive system MTC panel; クロンテック社製) におけるヒトTCH234の発現量 (コピー数) をTaqMan PCRにより測定した。同じcDNAについて、TaqMan GAPDH control reagents (アプライドバイオシステムズ社製) を用いてglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現量 (コピー数) も測定した。反応はTaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system (アプライドバイオシステムズ社製) にて、最初50℃2分間、さらに95℃10分間おいた後で、95℃で15秒、60℃で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返す、同時に検出を行った。

結果を図 23 に示す。

ヒトTCH234遺伝子産物 (mRNA) は消化管組織においては、回盲部で僅かな発現が見られ、十二指腸で高い発現が見られ、胃で最も高い発現を示した。

## 実施例 29

マウスTCH212遺伝子の部分配列の同定

2 種のプライマーDNA、プライマーm212A 1 (配列番号: 144) およびプライマーm212B 1 (配列番号: 145) を用いて、マウス精巣Marathon-Ready



cDNA（クロンテック社製）に対して、Advantage 2 DNA Polymerase（クロンテック社製）により、以下の条件(1)～(3)でPCRを行った。

(1) 95℃ 1分間

(2) 95℃ 30秒間－68℃ 3分間を35サイクル

5 (3) 68℃ 3分間

得られた増幅産物をゲル電気泳動後、約0.8kbの断片を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン社製）を用いて精製し、プライマーm212A1（配列番号：144）およびプライマーm212B1（配列番号：145）およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて反応を行い、PCR増幅産物の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて決定した。その結果、配列番号：143で表される680個の塩基配列を有するマウスTCH212遺伝子cDNAの部分配列を同定した。

### 15 実施例 30

マウスTCH212遺伝子産物の組織分布の解析

配列番号：143で表される塩基配列から設計した、2種のプライマーDNA、プライマーm212TF（配列番号：146）およびプライマーm212TR（配列番号：147）と、TaqManプローブm212T1（配列番号：148）を用いて、実施例15で調製したマウス各組織のcDNAにおけるマウスTCH212の発現量（コピー数）をTaqMan PCRにより測定した。同じcDNAについてTaqMan rodent GAPDH control reagents（アプライドバイオシステムズ社製）を用いてrodent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）の発現量（コピー数）も測定した。反応はTaqMan Universal PCR Master Mix（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system（アプライドバイオシステムズ社製）にて最初50℃2分間、さらに95℃10分間おいた後で、95℃で15秒、60℃で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。

結果を図24に示す。

マウスTCH212遺伝子産物（mRNA）は7週齢BALB/cマウスの各組織においては、

気管、前胃、前立腺、十二指腸、子宮、脾臓、眼球、胸腺、後胃、心臓、肺、海馬、骨髄で僅かな発現が見られ、卵巣、皮膚、空回腸、盲腸、直腸、脾臓、小脳、大脳で若干の発現が見られ、坐骨神経、結腸、延髄、脊髄で高い発現が見られ、精巣で最も高い発現が見られた

5

### 実施例 3 1

#### ラットTCH212遺伝子の部分配列の同定

実施例29で用いた2種のプライマーDNA、プライマーm212A1（配列番号：144）およびプライマーm212B1（配列番号：145）を用いて、ラット精巣  
10 Marathon-Ready cDNA（クロンテック社製）に対して、Advantage 2 DNA Polymerase（クロンテック社製）により、以下の条件(1)～(3)でPCRを行った。

(1) 95℃ 1分間

(2) 95℃ 30秒間—60℃ 30秒間—68℃ 3分間を35サイクル

15 (3) 68℃ 3分間

得られた増幅産物をゲル電気泳動後、約0.8kbの断片を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン社製）を用いて精製し、プライマーm212A1（配列番号：144）およびプライマーm212B1（配列番号：145）およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて反応を行い、PCR増幅産物の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて決定した。その結果、配列番号：149で表される771個の塩基配列を有するラットTCH212遺伝子  
20 cDNAの部分配列を同定した。

### 25 実施例 3 2

#### ラットTCH212遺伝子産物の組織分布の解析

配列番号：149で表される塩基配列から設計した、2種のプライマーDNA、プライマーr212TF（配列番号：150）およびプライマーr212TR（配列番号：151）と、TaqManプローブr212T1（配列番号：152）を用いて、実施例17で調製した

ラット各組織のcDNAにおけるラットTCH212の発現量（コピー数）をTaqMan PCRにより測定した。同じcDNAについてTaqMan rodent GAPDH control reagents（アプライドバイオシステムズ社製）を用いてrodent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）の発現量（コピー数）も測定した。反応は  
5 TaqMan Universal PCR Master Mix（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system（アプライドバイオシステムズ社製）にて最初50℃2分間、さらに95℃10分間おいた後で、95℃で15秒、60℃で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。

結果を図25に示す。

- 10 ラットTCH212遺伝子産物（mRNA）は12週齢Wistarラットの各組織においては、全ての組織で発現が見られたが、中でも、肺、十二指腸、空回腸で若干の発現が見られ、大脳、小脳、前立腺、結腸、眼球で高い発現が見られた。

### 実施例33

#### 15 ヒトTCH212発現ベクターの構築

ヒトTCH212（配列番号：42）発現ベクターを、以下の方法により作成した。

- 実施例7により得られたプラスミド10ngを鋳型として、プライマー2120F（配列番号：153）およびプライマー2120R（配列番号：154）を用いて、KOD DNA Polymerase（東洋紡社製）により以下の条件（1）～（3）でPCRを行った。5'末端側プライマー2120Fおよび3'末端側プライマー2120Rは、ベクターへのクローニングのために5'末端側にそれぞれBamH IサイトおよびNot Iサイトを付加するように設計した。
- 20

（1）94℃2分間

（2）94℃15秒間－60℃30秒間－68℃3.5分間を35サイクル

25 （3）68℃3分間

上記PCR反応液をゲル電気泳動後、主要バンドを精製した。これにより得られたPCR断片を、制限酵素BamH IおよびNot Iで、37℃で1時間保温することにより消化し、この反応液をゲル電気泳動後、精製した。これを、動物細胞発現ベクターであるpcDNA3.1(+)（インビトロジェン社製）のBamH IおよびNot Iサイト

に、Takara ligation kit ver.2 (タカラバイオ社製) を用いてライゲーションした。このライゲーション反応液を、コンピテント細胞である大腸菌 (*Escherichia coli*) JM109 (タカラバイオ社製) に形質転換した。

5 これにより得られた複数のコロニーからプラスミドを調製し、約3.5kbpの断片の挿入が確認された2クローンについて、塩基配列をプライマーDNA [プライマーBGH RV (配列番号: 124)、プライマーT 7 (配列番号: 8)、プライマーA 2 (配列番号: 48)、プライマーB 1 (配列番号: 49)、プライマーB 2 (配列番号: 50)、プライマーF 1 (配列番号: 51)、プライマーF 2 (配列番号: 52)、プライマーF 3 (配列番号: 53)、プライマーF 4 (配列番号: 54)、プライマーF 5 (配列番号: 55)、プライマーR 1 (配列番号: 56)、プライマーR 2 (配列番号: 57)、プライマーR 3 (配列番号: 58)、プライマーR 4 (配列番号: 59)]、およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて反応を行い、塩基配列をDNA  
10 シークエンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて決定した。その結果、配列番号: 43と比較して、いずれも1塩基置換が見られた。すなわち、「クローン1」では配列番号: 43の1185番目のCがAに変化し、「クローン2」では、2509番目のAがTに変化し、フレーム上ではいずれも終止コドンへの変化を伴っていた。

そこで、以下のような修正作業を行った。まず、開始コドンの上流に同一フレームの終止コドンを入れるため、上記「クローン2」のプラスミドDNAをNhe I  
20 で切断し、平滑化処理後、ライゲーションにより再環化し、大腸菌JM109に形質転換した。得られた「修正クローン2」のプラスミドDNAをBstE IIおよびNot Iで切断し、2509番目の1塩基置換を有するDNA断片 (約1.1kbp) を除去した。一方、「クローン1」のプラスミドDNAをBstE IIおよびNot Iで切断し、所定の配  
25 列であるDNA断片 (約1.1kbp) を調製した。上記2種のDNA断片をライゲーションし、大腸菌JM109に形質転換した。形質転換後に寒天培地上で30℃で2日間培養し、2日目に現れたコロニーからプラスミドの抽出を行った。このクローンについて、上記と同様に塩基配列を決定し、配列番号: 43に一致することを確認した。このプラスミドを有する形質転換体を、*Escherichia coli*

JM109/pCDNA3.1(+)-NheBlunt-TCH212と命名した。

### 実施例 3 4

#### マウスTCH200遺伝子の部分配列の同定

- 5        2種のプライマーDNA、プライマーm200A1（配列番号：156）およびプライマーm200B1（配列番号：157）を用いて、実施例15で調製したマウス皮膚cDNAに対して、Advantage 2 DNA Polymerase（クロンテック社製）により、以下の条件(1)～(5)でPCRを行った。

- 10        (1) 94℃3分間  
          (2) 94℃5秒間－72℃1分間を5サイクル  
          (3) 94℃5秒間－70℃1分間を5サイクル  
          (4) 94℃5秒間－68℃1分間を25サイクル  
          (5) 70℃10分間

- 15        得られた増幅産物をゲル電気泳動後、約1.1kbの断片を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン社製）を用いて精製した。これをm200A1（配列番号：156）およびプライマーm200B1（配列番号：157）を用いてBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて反応を行い、PCR増幅産物の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて決定した。ここで
- 20        決定された配列から2種のプライマーDNA、m200A2（配列番号：158）およびプライマーm200B2（配列番号：159）を設計し、これを用いて、PCR増幅産物のさらなる塩基配列決定を行った。その結果、配列番号：155で表される1064個の塩基配列を有するマウスTCH200遺伝子cDNAの部分配列を同定した。

### 25        実施例 3 5

#### マウスTCH200遺伝子産物の組織分布の解析

配列番号：155で表される塩基配列から設計したTaqManプローブm200T1（配列番号：160）と、実施例34で用いた、2種のプライマーDNA、プライマーm200A2（配列番号：158）およびプライマーm200B2（配列番号：159）を用いて、実施

例15で調製したマウス各組織のcDNAにおけるマウスTCH200の発現量（コピー数）をTaqMan PCRにより測定した。同じcDNAについてTaqMan rodent GAPDH control reagents（アプライドバイオシステムズ社製）を用いてrodent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）の発現量（コピー数）も測定した。反応はTaqMan Universal PCR Master Mix（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system（アプライドバイオシステムズ社製）にて最初50℃2分間、さらに95℃10分間おいた後で、95℃で15秒、60℃で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。

結果を図26に示す。

マウスTCH200遺伝子産物（mRNA）は7週齢BALB/cマウスの各組織においては、大脳、延髄、脊髄、坐骨神経、十二指腸、盲腸、結腸、卵巣、子宮で若干の発現が見られ、前胃、空回腸、前立腺で高い発現が見られ、皮膚、直腸で特に高い発現が見られた。

### 実施例36

#### ヒトTCH200発現ベクターの構築

ヒトTCH200（配列番号：66）発現ベクターを、以下の方法により作製した。実施例11により得られたプラスミドを鋳型として、プライマーTCH200F（配列番号：161）およびプライマーTCH200R（配列番号：162）を用いて、Pyrobest DNA Polymerase（タカラバイオ社製）により、以下の条件(1)－(5)でPCRを行った。5'末端側プライマーTCH200Fおよび3'末端側プライマーTCH200Rは、ベクターへのクローニングのために5'末端側にそれぞれKpnIサイト及びNotIサイトを付加するように設計した。

(1) 98℃5秒間

(2) 98℃5秒間－68℃290秒間を2サイクル

(3) 98℃5秒間－66℃290秒間を23サイクル

(4) 98℃5秒間－64℃290秒間を3サイクル

(5) 72℃7分間

上記PCR反応液を1%アガロースゲル電気泳動後、主要バンドを精製した。これにより得られたPCR断片を、制限酵素、KpnI及びNotIを用いて、37℃で1時間保温することにより消化し、この反応液を1%アガロースゲル電気泳動後、精製した。これを、動物細胞発現ベクターであるpcDNA3.1(+) (インビトロジェン社製) のKpnIサイト及びNotIサイトに、Takara ligation kit ver.2 (タカラバイオ社製) を用いてライゲーションした。このライゲーション反応液をコンピ

5 テント細胞である大腸菌 (*Escherichia coli*) JM109 (タカラバイオ社製) にヒートショック法により形質転換した。これにより得られた複数のコロニーからプラスミドを調製し、この塩基配列をプライマーDNA [プライマーT7 (配列番号: 163)、プライマーAF (配列番号: 164)、プライマーBF (配列番号: 165)、プライマーCF (配列番号: 166)、プライマーDF (配列番号: 167)、プライマーBGH RV (配列番号: 168)、プライマーDR (配列番号: 169)、プライマーCR (配列番号: 170)、プライマーBR (配列番号: 171)、プライマーAR (配列番号: 172)]、およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (ア

10 プライドバイオシステムズ社製) を用いて反応を行い、塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて確認した。このプラスミドを有する形質転換体を、*Escherichia coli* JM109/pCDNA3.1(+)/TCH200と命名した。

## 20 実施例 37

ヒトTCH200発現CHO細胞株の作製および導入遺伝子発現量の測定

*Escherichia coli* JM109/pCDNA3.1(+)/TCH200を培養し、この大腸菌体からEndoFree Plasmid Maxi Kit (キアゲン社製) を用いてプラスミドDNAを調製した。このプラスミドDNAをNucleofector (アマクサ社製) およびCell Line

25 Nucleofector Kit T (アマクサ社製) を用いて添付のプロトコールに従ってCHO-K1細胞に導入した。キットに添付されているsupplementを添加した常温のsolution T 100  $\mu$ lで $1 \times 10^6$ 個のCHO-K1細胞を懸濁し、この懸濁液に2  $\mu$ gのプラスミドDNAを混合したのち、キュベットに入れ、NucleofectorのプログラムU-27を施行した。直ちに37℃に暖めておいた10%ウシ胎児血清 (ICNバイオメディカ

ルズ社製)を含むRPMI1640培地(日研生物医学研究所社製)を500 $\mu$ l加え、さらに10%ウシ胎児血清を含むHam's F12培地(日研生物医学研究所社製)を1ml入れて、37℃に暖めておいた6 well plateに滴下し培養を行なった。3日後に0.4mg/mlのジェネティシン(インビトロジェン社製)を含む培地に交換し、ヒトTCH200発現細胞の選択を開始した。選択を開始してから4日後に、トランスフェクションした細胞を剥がし、回収した細胞を1wellあたり100個で、24 well plateに10%ウシ胎児血清を含むFBS-Ham's F12培地で播いた。4日後、各wellに生育したコロニー数とコロニー1個あたりのおよその細胞数を計測することにより、1well当たりの細胞数を算出し、この数値を元に96 well plate に1wellあたり1個となるように細胞を播き、ヒトTCH200発現細胞のモノクローン化を行った。

増殖したヒトTCH200発現モノクローン細胞からRNeasy 96 Kit(キアゲン社製)を用いてtotal RNAを調製した。調製したtotal RNA に対してTaqMan Reverse Transcription Reagents(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて逆転写反応を行いcDNAを調製した。これについて、実施例12で用いたプライマーTMF(配列番号:94)およびプライマーTMR(配列番号:95)と、TaqMan プロープP1(配列番号:96)とを用いて、ヒトTCH200の発現量をTaqMan PCRにより測定した。

反応はTaqMan Universal PCR Master Mix(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system(アプライドバイオシステムズ社製)にて、最初50℃2分間、さらに95℃10分間おいた後で、95℃で15秒、60℃で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。ヒトTCH200遺伝子高発現細胞株として、クローンNo. G10を選択した。

### 実施例38

ヒトTCH230、ヒトTCH234、ヒトTCH212およびヒトTCH200遺伝子の市販正常ヒト細胞における発現解析

#### (1) 正常ヒト細胞cDNAの調製

正常ヒト細胞はCambrex BioScience Walkersville社製品を購入し、製品添付



の使用説明書記載の方法に従って培養した。実験に使用した細胞と各々の細胞の培養に用いた培地を〔表3〕に示す。

〔表3〕

No.	細胞名	培地
1	臍帯静脈血管内皮細胞 CC-2517	ブレットキットEGM CC-3124
2	大動脈血管内皮細胞 CC-2535	ブレットキットEGM-2 CC-3162
3	冠状動脈血管内皮細胞 CC-2585	ブレットキットEGM-2MV CC-3202
4	大動脈平滑筋細胞 CC-2571	ブレットキットSmGM-2 CC-3182
5	冠状動脈平滑筋細胞 CC-2583	ブレットキットSmGM-2 CC-3182
6	子宮平滑筋細胞 CC-2562	ブレットキットSmGM-2 CC-3182
7	気管支平滑筋細胞 CC-2576	ブレットキットSmGM-2 CC-3182
8	骨格筋衛星細胞 CC-2561	ブレットキットSkGM CC-3160
9	乳腺上皮細胞 CC-2551	ブレットキットMEGM CC-3150
10	気管支上皮細胞 (RA添加) CC-2540	ブレットキットSAGM CC-3118
11	気管支上皮細胞 (RA無添加) CC-2541	ブレットキットSAGM CC-3118
12	肺繊維芽細胞 CC-2512	ブレットキットFGM-2 CC-3132
13	腎臓近位尿細管上皮細胞 CC-2553	ブレットキットREGM CC-3190
14	メサングウム細胞 CC-2559	ブレットキットMsGM CC-3146
15	腎臓皮質上皮細胞 CC-2554	ブレットキットREGM CC-3190
16	間葉系幹細胞 PT-2501	ブレットキットMSCGM PT-3001
17	膝関節軟骨細胞 CC-2550	ブレットキットCGM CC-3216
18	骨芽細胞 CC-2538	ブレットキットOGM CC-3207

5

各細胞を75cm<sup>2</sup>培養フラスコにサブコンフルエントになるよう培養して、トリプシン-EDTA処理により細胞を回収した。回収した細胞から、ISOGEN（ニッポンジーン社製）、またはRNeasy Mini Kit（キアゲン社製）を用いてtotal RNAを

調製した（いずれの場合もDNase処理により混入DNAを除去した）。調製した total RNA に対してTaqMan Reverse Transcription Reagents（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて逆転写反応を行いcDNAを調製した。

（2）ヒトTCH230、ヒトTCH234、ヒトTCH212およびヒトTCH200遺伝子の市販正常ヒト細胞における発現解析

上記の各cDNAにおける発現量（Ct値）をTaqMan PCRにより以下のように測定した。ヒトTCH230については、実施例2で用いられたプライマーTF（配列番号：15）およびプライマーTR（配列番号：16）と、TaqManプローブT1（配列番号：17）とを用い、ヒトTCH234については、実施例6で用いた、プライマーTMF（配列番号：32）およびプライマーTMR（配列番号：33）と、TaqManプローブP1（配列番号：38）とを用い、ヒトTCH212については、実施例8で用いた、プライマーTF（配列番号：63）およびプライマーTR（配列番号：64）と、TaqManプローブT1（配列番号：65）とを用い、ヒトTCH200については実施例12で用いたプライマーTMF（配列番号：94）およびプライマーTMR（配列番号：95）と、TaqManプローブP1（配列番号：96）とを用いた。同じcDNAについてTaqMan GAPDH control reagents（アプライドバイオシステムズ社製）を用いてglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）の発現量（Ct値）も測定した。反応はTaqMan Universal PCR Master Mix（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system（アプライドバイオシステムズ社製）にて最初50℃2分間、さらに95℃10分間おいた後で、95℃で15秒、60℃で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。

以上の方法で得た測定値をもとにして、各TCH遺伝子（ヒトTCH230、ヒトTCH234、ヒトTCH212およびヒトTCH200）のGAPDHに対する相対的発現量を次式に従って算出した。

$$\text{相対的発現量} = 1 / 2^{A-B}$$

上記式において、AはヒトTCH230遺伝子、ヒトTCH234遺伝子、ヒトTCH212遺伝子またはヒトTCH200遺伝子のCt値を、BはGAPDH遺伝子のCt値をそれぞれ表す。

ヒトTCH230遺伝子の結果を図27に示す。

ヒトTCH230は大動脈血管内皮細胞、冠状動脈血管内皮細胞、大動脈平滑筋細

胞、冠状動脈平滑筋細胞、子宮平滑筋細胞、乳腺上皮細胞、肺繊維芽細胞、腎臓近位尿細管上皮細胞、メサングウム細胞、腎臓皮質上皮細胞、膝関節軟骨細胞および骨芽細胞で若干の発現が見られ、気管支上皮細胞（RA添加）および気管支上皮細胞（RA無添加）で強い発現が見られた。

5 ヒトTCH234遺伝子の結果を図28に示す。

ヒトTCH234は大動脈血管内皮細胞、冠状動脈血管内皮細胞および腎臓近位尿細管上皮細胞で若干の発現が見られ、腎臓皮質上皮細胞で特に強い発現が見られた。

ヒトTCH200遺伝子の結果を図29に示す。

10 ヒトTCH200は大動脈血管内皮細胞、冠状動脈血管内皮細胞、大動脈平滑筋細胞、骨格筋衛星細胞および肺繊維芽細胞で若干の発現が見られ、腎臓皮質上皮細胞で強い発現が見られ、乳腺上皮細胞、気管支上皮細胞（RA添加）および気管支上皮細胞（RA無添加）で特に強い発現が見られた。

ヒトTCH212はいずれの細胞でも発現が見られなかった。

15

### 実施例39

慢性閉塞性肺疾患（COPD）モデルマウス肺におけるマウスTCH234およびマウスTCH212遺伝子産物の発現解析

(1) タバコ煙曝露によるCOPDモデルマウスの作製と肺cDNAの調製

20 COPDモデルは、C57BL/6Nマウス（6週齢、日本チャールスリバー社製）に Kentucky Reference Cigarette 1R1から発生する主流煙を、1～4時間/日、5日/週ずつ計6ヶ月間吸入させて作製した。すなわち、Kentucky Reference Cigarette 1R1をタバコ煙発生装置（SG-200、柴田科学社製）に装着し、35 ml/puff、10 puff/min、25 puff/cigaretteの条件で主流煙を採取した。得られ  
25 た主流煙を空気中で3%（V/V）に希釈した後に、マウスを入れたアクリル製の曝露チャンバーに送気し、自発呼吸下のマウスに所定の時間タバコ煙を吸入させた。なお、コントロール群には正常マウスを用いた。

最終曝露が終了した翌日にマウスをペントバルビタール麻酔により致死させ、気管支肺胞洗浄を施行した後に肺を摘出した。摘出肺は液体窒素中で凍結させ、

凍結組織破碎装置で粉碎した後に、その湿重量の10倍量に相当するISOGEN（ニッポンジーン社製）に浸した。1ヶ月タバコ煙曝露群（n=10）、そのコントロール群（n=6）、3ヶ月タバコ煙曝露群（n=8）、そのコントロール群（n=8）、6ヶ月タバコ煙曝露群（n=8）、そのコントロール群（n=8）からISOGENを用いて、  
5 添付のマニュアルに従い、total RNAを抽出した。さらにQIAGEN RNeasy Mini kit（キアゲン社製）とRNase-Free DNase set（キアゲン社製）を用いて、混入DNAを除去した。調製したtotal RNA に対してTaqMan Reverse Transcription Reagents（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて逆転写反応を行いcDNAを調製した。

10 (2) COPDモデルマウス肺におけるマウスTCH234遺伝子産物の発現解析

実施例22で用いた、2種のプライマーDNA、プライマーm234-TMF（配列番号：128）およびプライマーm234-TMR（配列番号：129）と、TaqManプローブm234T1（配列番号：130）を用いて、上記(1)で調製したCOPDモデルマウス肺cDNAにおけるマウスTCH234の発現量（Ct値）をTaqMan PCRにより測定した。同じcDNAについて、Eukaryotic 18S rRNA Pre-Developed TaqMan Assay Reagents（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、18S rRNAの発現量（Ct値）も測定した。  
15 反応はTaqMan Universal PCR Master Mix（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system（アプライドバイオシステムズ社製）にて最初50℃2分間、さらに95℃10分間おいた後で、95℃で15秒、  
20 60℃で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。

以上の方法で得た測定値をもとにして、マウスTCH234の18S rRNAに対する相対的発現量を次式に従って算出した。

$$\text{相対的発現量} = 1 / 2^{A-B}$$

上記式において、AはマウスTCH234遺伝子のCt値を、Bは18S rRNA遺伝子の  
25 Ct値をそれぞれ表す。

統計解析にはSASソフトウェア（SAS社製）を用いて、Studentのt検定を行い、 $p < 0.05$ を有意であるとした。

結果を図30に示す。

マウスTCH234はCOPDモデルマウス肺で、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月の全てにおいて、

タバコ煙曝露群で有意な発現増加が見られた（1ヶ月： $p=0.0415$ 、3ヶ月： $p=0.0058$ 、6ヶ月： $p=0.0001$ ）。このことから、TCH234はCOPDなどの呼吸器疾患に関与する可能性が考えられた。

### (3) COPDモデルマウス肺におけるマウスTCH212遺伝子産物の発現解析

5 実施例30で用いた、2種のプライマーDNA、プライマーm212TF（配列番号：146）およびプライマーm212TR（配列番号：147）と、TaqManプローブm212T1（配列番号：148）を用いて、上記(1)で調製したCOPDモデルマウス肺cDNAにおけるマウスTCH212の発現量（Ct値）をTaqMan PCRにより測定し、上記(2)と同様に18S rRNAに対する相対的発現量を算出した。統計解析は上記(2)と同様に行っ  
10 た。

結果を図31に示す。マウスTCH212はCOPDモデルマウス肺で、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月の全てにおいて、タバコ煙曝露群で有意な発現減少が見られた（1ヶ月： $p=0.0014$ 、3ヶ月： $p=0.0004$ 、6ヶ月： $p=0.0001$ ）。このことから、TCH212はCOPDなどの呼吸器疾患に関与する可能性が考えられた。

## 15 実施例40

### 大腸炎モデルマウス大腸におけるマウスTCH230遺伝子産物の発現解析

#### (1) DSS投与による大腸炎モデルマウスの作製と大腸cDNAの調製

大腸炎モデルマウスはBALB/cAマウス（オス、6週齢、日本クレア社製）にDSS  
20 (Dextran Sulfate Sodium 5000、和光純薬社製）を投与することで作製した。

すなわち、マウスに5%DSS溶液を自由飲水させて、下痢の症状が現れる2日目、および出血も合わせて認められるようになる7日目に、二酸化炭素ガス下に動物を屠殺し、大腸の一部（肛門輪から5cm）を摘出した。なお、コントロール群には正常マウスを用いた。摘出した大腸は、生理食塩水で洗浄後、3匹分をまとめて、ISOGEN（ニッポンジーン社製）を用いて、添付のマニュアルに従い、total RNAを抽出した。さらにQIAGEN RNeasy Mini kitとRNase-Free DNase set（キア  
25 ゲン社製）を用いて、混入DNAを除去した。調製したtotal RNA に対してTaqMan Reverse Transcription Reagents（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて逆転写反応を行いcDNAを調製した。

(2) 大腸炎モデルマウス大腸におけるマウスTCH230遺伝子産物の発現解析  
実施例14で用いた、2種のプライマーDNA、プライマーm230TF（配列番号：  
113）およびプライマーm230TR（配列番号：114）と、TaqManプローブm230T1  
（配列番号：115）を用いて、上記(1)で調製した大腸炎モデルマウスの大腸の  
5 cDNAにおけるマウスTCH230の発現量（Ct値）をTaqMan PCRにより測定した。同  
じcDNAについて、Eukaryotic 18S rRNA Pre-Developed TaqMan Assay Reagents  
（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、18S rRNAの発現量（Ct値）も  
測定した。反応はTaqMan Universal PCR Master Mix（アプライドバイオシステ  
ムズ社製）を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system（アプライ  
10 ドバイオシステムズ社製）にて最初50℃2分間、さらに95℃10分間おいた後で、  
95℃で15秒、60℃で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検  
出を行った。

以上の方法で得た測定値をもとにして、マウスTCH230の18S rRNAに対する相  
対的発現量を次式に従って算出した。

15 相対的発現量 =  $1 / 2^{A-B}$

上記式において、AはマウスTCH230遺伝子のCt値を、Bは18S rRNA遺伝子の  
Ct値をそれぞれ表す。

結果を図32に示す。

マウスTCH230は大腸炎モデルマウスの大腸で、2日目と7日目のいずれにおい  
20 ても、DSS投与群で発現増加が見られた。このことから、TCH230は潰瘍性大腸炎、  
クローン病、虚血性大腸炎などの大腸炎に関与する可能性が考えられた。

#### 産業上の利用可能性

本発明のタンパク質A、それをコードするポリヌクレオチドおよびそれに対  
25 する抗体、アンチセンスポリヌクレオチドなどは、例えば高脂血症、生殖器疾  
患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器疾患  
（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消  
化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性  
閉塞性肺疾患、気管支喘息など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体

- 腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、糖尿病、甲状腺機能低下、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、
- 5 好ましくは、高脂血症、動脈硬化、生殖器疾患、消化器疾患などの診断マーカー等として有用である。本発明のタンパク質A、それをコードするポリヌクレオチドおよび抗体などは、該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物、該タンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物、該タンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングなどに有用である。
- 10 該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物、該タンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩などは、例えば、高脂血症、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、糖尿病、甲状腺機能低下、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、
- 15 20 25

好ましくは、高脂血症、動脈硬化、生殖器疾患、消化器疾患などの予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明のタンパク質B、それをコードするポリヌクレオチドおよびそれに対する抗体、アンチセンスポリヌクレオチドなどは、例えば腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、脾臓疾患、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）など、好ましくは、呼吸器疾患、腎疾患、消化器疾患などの診断マーカー等として有用である。本発明のタンパク質B、それをコードするポリヌクレオチドおよび抗体などは、該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物、該タンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物、該タンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングに有用である。該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物、該タンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物、該タンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩などは、例えば、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、



自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、胸腺疾患、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巢嚢腫など）、脾臓疾患、癌（例、精巣腫瘍、卵巢癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）など、好ましくは、呼吸器疾患、腎疾患、消化器疾患などの予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明のタンパク質C、それをコードするポリヌクレオチドおよびそれに対する抗体、アンチセンスポリヌクレオチドなどは、例えば脾臓疾患（例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巢嚢腫など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、糖尿病、高脂血症、胆汁うっ滞、または癌（例、精巣腫瘍、卵巢癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、脾臓疾患、中枢神経系疾患、消化器疾患、呼吸器疾患などの診断マーカー等として有用である。本発明のタンパク質C、それをコードするポリヌクレオチドおよび抗体などは、該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物、該タンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物、該タンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングに有用である。該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物、該タンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物、該タンパク質

の発現を促進または阻害する化合物またはその塩などは、例えば、脾臓疾患

(例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など)、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など)、中枢神経系疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、統合失調症、脳血管性痴呆、脳虚血、

5 てんかんなど)、消化器疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など)、呼吸器疾患(例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、糖尿病、高脂血症、胆汁うっ滞、または癌(例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、胸腺腫、筋肉腫など)など、好ましくは、脾臓疾患、中枢神経系疾患、消化器疾患、呼吸器疾患などの予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明のタンパク質D、それをコードするポリヌクレオチドおよびそれに対する抗体、アンチセンスポリヌクレオチドなどは、例えば、炎症性疾患(例、

15 敗血症、肺炎、脳炎、髄膜炎、肝炎、心筋炎、胸膜炎など)、自己免疫疾患(例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど)、アレルギー性疾患(例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など)、リウマチ性疾患

(例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など)、糖尿病性神経症、胸腺疾患、免疫不全(例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など)、消化器疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など)、呼吸器疾患(例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、循環器疾患(例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など)、肝臓疾患(例、肝硬変な

20 ど)、腎疾患(例、腎不全、尿毒症など)、筋肉疾患(例、筋萎縮症など)、脾臓疾患(例、脾炎、脾嚢胞性線維症などの脾機能不全など)、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など)、熱傷、疼痛症候群

(例、癌性疼痛、関連痛など)、癌(例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、

結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、筋肉腫など) など、好ましくは、炎症性疾患、リウマチ性疾患、糖尿病性神経症などの診断マーカー等として有用である。本発明のタンパク質D、それをコードするポリヌクレオチドおよび抗体などは、

5 該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物、該タンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物、該タンパク質の発現を促進または阻害する化合物、該タンパク質とそのリガンドとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングに有用である。該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物、該タンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物、該タンパク質の発現を促進または阻害する化合物、該タンパク質とそのリガンドとの結合性

10 を変化させる化合物またはその塩などは、例えば、炎症性疾患（例、敗血症、肺炎、脳炎、髄膜炎、肝炎、心筋炎、胸膜炎など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー性疾患（例、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）、糖尿病性神経症、胸腺疾患、免疫不全

15 （例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、Q

20 T延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、筋肉疾患（例、筋萎縮症など）、膵臓疾患（例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、熱傷、疼痛症候群（例、癌性疼痛、関連痛など）、癌（例、精巣腫瘍、卵巣癌、乳癌、食道癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸

25 癌、膵臓癌、胸腺腫、筋肉腫など）など、好ましくは、炎症性疾患、リウマチ性疾患、糖尿病性神経症などの予防・治療剤などとして使用することができる。

## 請求の範囲

1. 配列番号：1、配列番号：14または配列番号：104で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。
- 5 2. 配列番号：1または配列番号：14で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。
3. 配列番号：104で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。
- 10 4. 請求項1記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。
5. 請求項1記載のタンパク質または請求項4記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
6. DNAである請求項5記載のポリヌクレオチド。
7. 配列番号：2、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：105または配列番号：112で表される塩基配列からなるDNA。
- 15 8. 請求項5記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
9. 請求項8記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
10. 請求項9記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のタンパク質または請求項4記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項1記載のタンパク質もしくは請求項4記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法。
- 20 11. 請求項1記載のタンパク質もしくは請求項4記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。
12. 請求項5記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
- 25 13. 請求項1記載のタンパク質もしくは請求項4記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
14. 請求項13記載の抗体を含有してなる医薬。
15. 請求項13記載の抗体を含有してなる診断薬。
16. 請求項5記載のポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的

に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド。

17. 請求項16記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

18. 請求項1記載のタンパク質もしくは請求項4記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、請求項1記載のタンパク質もしくは請求  
5 項4記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

19. 請求項1記載のタンパク質もしくは請求項4記載の部分ペプチドまたはその塩の活性が、該タンパク質の基質の輸送活性である請求項18記載のスクリーニング方法。

10 20. 請求項1記載のタンパク質もしくは請求項4記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、請求項1記載のタンパク質もしくは請求項4記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

21. 請求項18記載のスクリーニング方法または請求項19記載のスクリー  
15 ニング用キットを用いて得られる、請求項1記載のタンパク質もしくは請求項4記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

22. 請求項21記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

23. 請求項5記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項  
20 1記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

24. 請求項5記載のポリヌクレオチドを含有してなる、請求項1記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリー  
ニング用キット。

25 25. 請求項23記載のスクリーニング方法または請求項24記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項1記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩。

26. 請求項25記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

27. 高脂血症、動脈硬化、生殖器疾患または消化器疾患の予防・治療剤で

ある請求項 1 1、請求項 1 2、請求項 1 4、請求項 1 7、請求項 2 2 または請求項 2 6 記載の医薬。

2 8. 哺乳動物に対して、請求項 2 1 または請求項 2 5 記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする高脂血症、動脈硬化、生殖器疾患  
5 または消化器疾患の予防・治療方法。

2 9. 高脂血症、動脈硬化、生殖器疾患または消化器疾患の予防・治療剤を製造するための請求項 2 1 または請求項 2 5 記載の化合物またはその塩の使用。

3 0. 配列番号：1 8 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。

10 3 1. 配列番号：1 8 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。

3 2. 請求項 3 0 記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。

3 3. 請求項 3 0 記載のタンパク質または請求項 3 2 記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。

15 3 4. DNA である請求項 3 3 記載のポリヌクレオチド。

3 5. 配列番号：1 9 または配列番号：4 1 で表される塩基配列からなる DNA。

3 6. 請求項 3 3 記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

3 7. 請求項 3 6 記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

20 3 8. 請求項 3 7 記載の形質転換体を培養し、請求項 3 0 記載のタンパク質または請求項 3 2 記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採用することを特徴とする請求項 3 0 記載のタンパク質もしくは請求項 3 2 記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法。

25 3 9. 請求項 3 0 記載のタンパク質もしくは請求項 3 2 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。

4 0. 請求項 3 3 記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

4 1. 請求項 3 0 記載のタンパク質もしくは請求項 3 2 記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

4 2. 請求項 4 1 記載の抗体を含有してなる医薬。

4 3. 請求項 4 1 記載の抗体を含有してなる診断薬。

4 4. 請求項 3 3 記載のポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド。

4 5. 請求項 4 4 記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

5 4 6. 請求項 3 0 記載のタンパク質もしくは請求項 3 2 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、請求項 3 0 記載のタンパク質もしくは請求項 3 2 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

10 4 7. 請求項 3 0 記載のタンパク質もしくは請求項 3 2 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、請求項 3 0 記載のタンパク質もしくは請求項 3 2 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

15 4 8. 請求項 4 6 記載のスクリーニング方法または請求項 4 7 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項 3 0 記載のタンパク質もしくは請求項 3 2 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

4 9. 請求項 4 8 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

20 5 0. 請求項 3 3 記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項 3 0 記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

5 1. 請求項 3 3 記載のポリヌクレオチドを含有してなる、請求項 3 0 記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

25 5 2. 請求項 5 0 記載のスクリーニング方法または請求項 5 1 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項 3 0 記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩。

5 3. 請求項 5 2 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

5 4. 呼吸器疾患、腎疾患または消化器疾患の予防・治療剤である請求項 3 9、請求項 4 0、請求項 4 2、請求項 4 5、請求項 4 9 または請求項 5 3 記載

の医薬。

55. 哺乳動物に対して、請求項48または請求項52記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする呼吸器疾患、腎疾患または消化器疾患の予防・治療方法。

5 56. 呼吸器疾患、腎疾患または消化器疾患の予防・治療剤を製造するための請求項48または請求項52記載の化合物またはその塩の使用。

57. 配列番号：42で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。

10 58. 配列番号：42で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。

59. 請求項57記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。

60. 請求項57記載のタンパク質または請求項59記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。

61. DNAである請求項60記載のポリヌクレオチド。

15 62. 配列番号：43、配列番号：60、配列番号：61または配列番号：62で表される塩基配列からなるDNA。

63. 請求項60記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

64. 請求項63記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

20 65. 請求項64記載の形質転換体を培養し、請求項57記載のタンパク質または請求項59記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項57記載のタンパク質もしくは請求項59記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法。

66. 請求項57記載のタンパク質もしくは請求項59記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。

25 67. 請求項60記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

68. 請求項57記載のタンパク質もしくは請求項59記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

69. 請求項68記載の抗体を含有してなる医薬。

70. 請求項68記載の抗体を含有してなる診断薬。



7 1. 請求項 6 0 記載のポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド。

7 2. 請求項 7 1 記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

5 7 3. 請求項 5 7 記載のタンパク質もしくは請求項 5 9 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、請求項 5 7 記載のタンパク質もしくは請求項 5 9 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

10 7 4. 請求項 5 7 記載のタンパク質もしくは請求項 5 9 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、請求項 5 7 記載のタンパク質もしくは請求項 5 9 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

15 7 5. 請求項 7 3 記載のスクリーニング方法または請求項 7 4 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項 5 7 記載のタンパク質もしくは請求項 5 9 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

7 6. 請求項 7 5 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

7 7. 請求項 6 0 記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項 5 7 記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

20 7 8. 請求項 6 0 記載のポリヌクレオチドを含有してなる、請求項 5 7 記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

25 7 9. 請求項 7 7 記載のスクリーニング方法または請求項 7 8 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項 5 7 記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩。

8 0. 請求項 7 9 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

8 1. 膵臓疾患、中枢神経系疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤である請求項 6 6、請求項 6 7、請求項 6 9、請求項 7 2、請求項 7 6 または請求項 8 0 記載の医薬。

8 2. 哺乳動物に対して、請求項 7 5 または請求項 7 9 記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする脾臓疾患、中枢神経系疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療方法。

5 8 3. 脾臓疾患、中枢神経系疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤を製造するための請求項 7 5 または請求項 7 9 記載の化合物またはその塩の使用。

8 4. 配列番号：6 6 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。

10 8 5. 配列番号：6 6 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。

8 6. 請求項 8 4 記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。

8 7. 請求項 8 4 記載のタンパク質または請求項 8 6 記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。

8 8. DNAである請求項 8 7 記載のポリヌクレオチド。

15 8 9. 配列番号：6 7 または配列番号：1 0 3 で表される塩基配列からなる DNA。

9 0. 請求項 8 6 記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

9 1. 請求項 9 0 記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

20 9 2. 請求項 9 1 記載の形質転換体を培養し、請求項 8 4 記載のタンパク質または請求項 8 6 記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項 8 4 記載のタンパク質もしくは請求項 8 6 記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法。

9 3. 請求項 8 4 記載のタンパク質もしくは請求項 8 6 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。

25 9 4. 請求項 8 7 記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

9 5. 請求項 8 4 記載のタンパク質もしくは請求項 8 6 記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

9 6. 請求項 9 5 記載の抗体を含有してなる医薬。

9 7. 請求項 9 5 記載の抗体を含有してなる診断薬。

98. 請求項87記載のポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド。

99. 請求項98記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

5 100. 請求項84記載のタンパク質もしくは請求項86記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、請求項84記載のタンパク質もしくは請求項86記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

10 101. 請求項84記載のタンパク質もしくは請求項86記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、請求項84記載のタンパク質もしくは請求項86記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

15 102. 請求項100記載のスクリーニング方法または請求項101記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項84記載のタンパク質もしくは請求項86記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

103. 請求項102記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

104. 請求項87記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項84記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

20 105. 請求項87記載のポリヌクレオチドを含有してなる、請求項84記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

25 106. 請求項104記載のスクリーニング方法または請求項105記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項84記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩。

107. 請求項106記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

108. 請求項84記載のタンパク質もしくは請求項86記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする該タンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対するリガンドの決定方法。

109. 請求項84記載のタンパク質もしくは請求項86記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、リガンドと該タンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

- 5 110. 請求項84記載のタンパク質もしくは請求項86記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、リガンドと該タンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

- 10 111. 請求項109記載のスクリーニング方法または請求項110記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと請求項84記載のタンパク質もしくは請求項86記載の部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

112. 請求項111記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

- 15 113. 炎症性疾患、リウマチ性疾患または糖尿病性神経症の予防・治療剤である請求項93、請求項94、請求項96、請求項99、請求項103、請求項107または請求項112記載の医薬。

114. 哺乳動物に対して、請求項102、請求項106記載または請求項111記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする炎症性疾患、リウマチ性疾患または糖尿病性神経症の予防・治療方法。

- 20 115. 炎症性疾患、リウマチ性疾患または糖尿病性神経症の予防・治療剤を製造するための請求項102、請求項106記載または請求項111記載の化合物またはその塩の使用。

1 MNDPNS CVDNATVCSGASC - - - VVPESNPNNI LSVV LSTV ISBT  
1 MRA - - NC - SSSSACPANS SREELPVGLEVHGNLELV FTVV TCH230

38 LTI LLA LVMFS MGCNVEIKKFLGH IKRPWGI CVGF L C Q F G ISBT  
38 STVMMGL LMFSL GCS V E I R K L W S H I R R P W G I A V G L L C Q F G TCH230

78 IMPL TGFILSVAFDILPLQA V V V L I I G C C P G G T A S N I L A Y ISBT  
78 LMPF TAYLLAISFSLKPVQAIAVLIIMGCCPGGTI S N I F T F TCH230

118 WVDGDM DLS V S M T T C S T L L A L G M M P L C L L I Y T K M W V D S G S ISBT  
118 WVDGDM DLS I S M T T C S T V A A L G M M P L C I Y L Y T W S W S L Q Q N TCH230

158 I V I P Y D N I G T S L V A L V V P V S I G M F V N H K W P Q K A K I I L K I G ISBT  
158 L T I P Y Q N I G I T L V C L T I P V A F G V Y V N Y R W P K Q S K I I L K I G TCH230

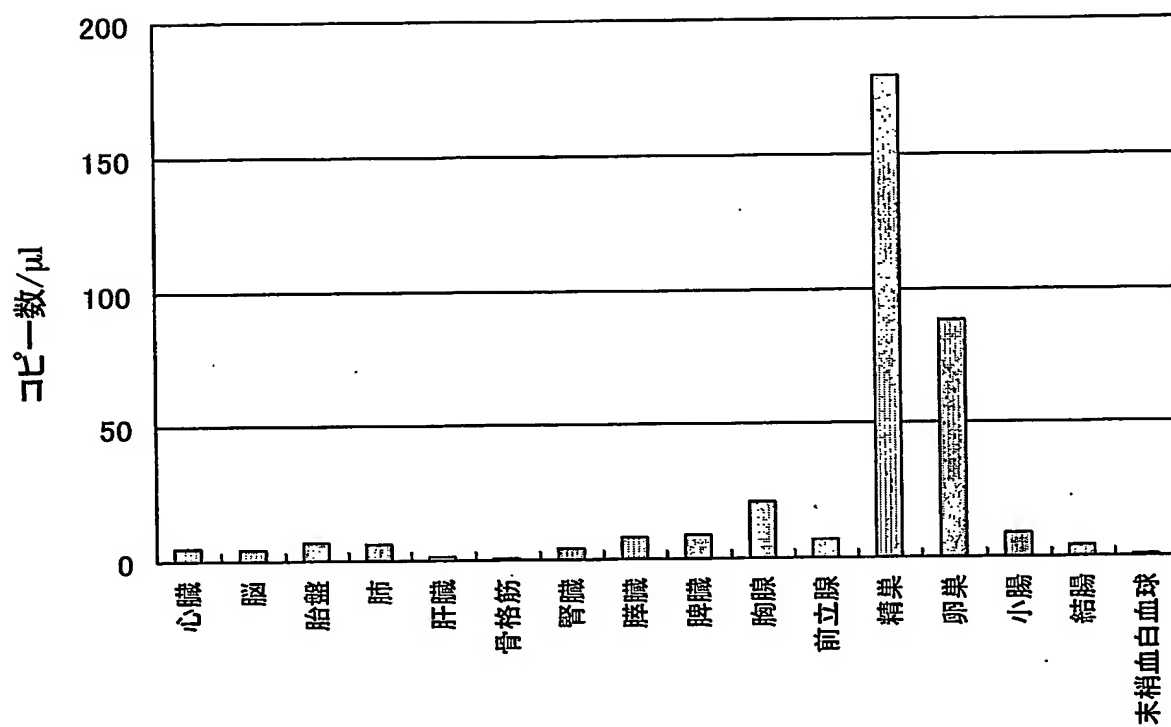
198 S I A G A I L I V L I A V V G G I L Y Q S A W I I A P K L W I I G T I F P V A G ISBT  
198 A V V G G V L L L V V A V A G V V L A K G S W N S D I T L L T I S F I F P L I G TCH230

238 Y S L G F L L A R I A G L P W Y R C R T V A F E T G M Q N T Q L C S T I V Q L S ISBT  
238 H V T G F L L A L P T H Q S W Q R C R T I S L E T G A Q N I Q M C I T M L Q L S TCH230

278 F T P E E L N V V F T F P L I Y S I F Q L A F A A I F L G F Y V A Y K K C - - ISBT  
278 F T A E H L V Q M L S F P L A Y G L F Q L I D G F L I V A A Y Q T Y K R R L K N TCH230

315 - H G K N K A - - - E I P E S K E N G T E P E S S F Y - - - K A N G G F Q P D E ISBT  
318 K H G K K N S G C T E V C H T R K S T S S R E T N A F L E V N E E G A I T P G P TCH230

348 - - - - - K ISBT  
358 P G P M D C H R A L E P V G H I T S C E TCH230



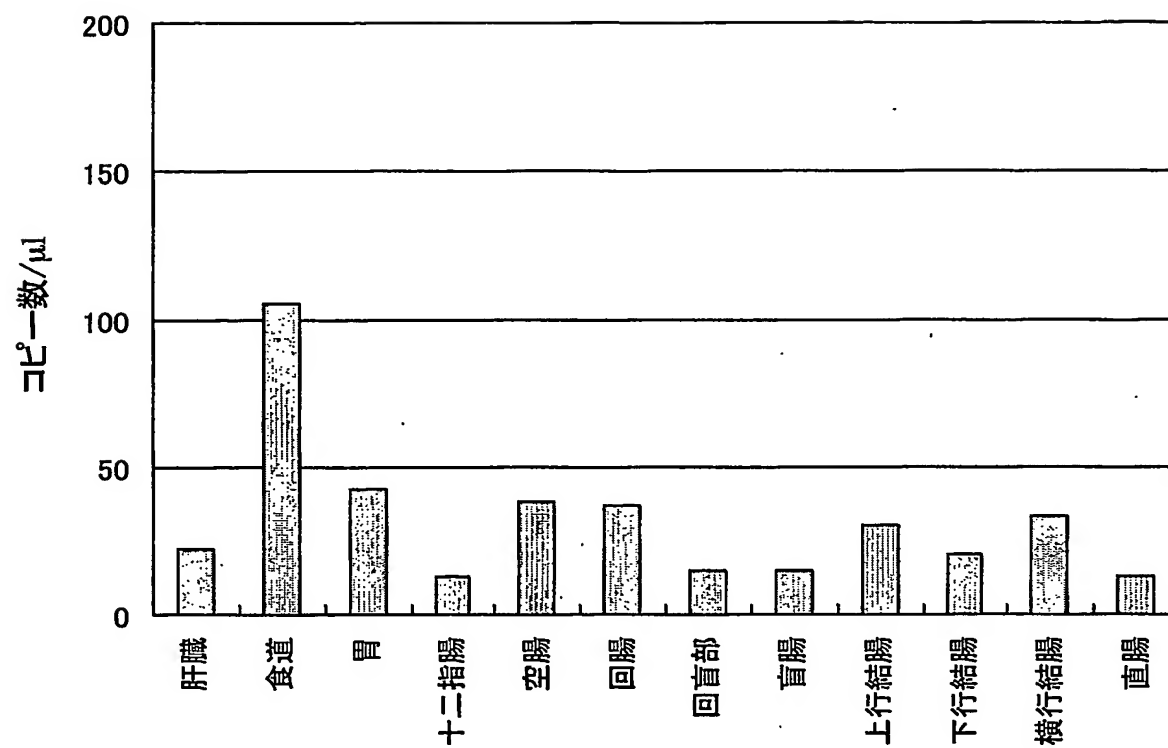
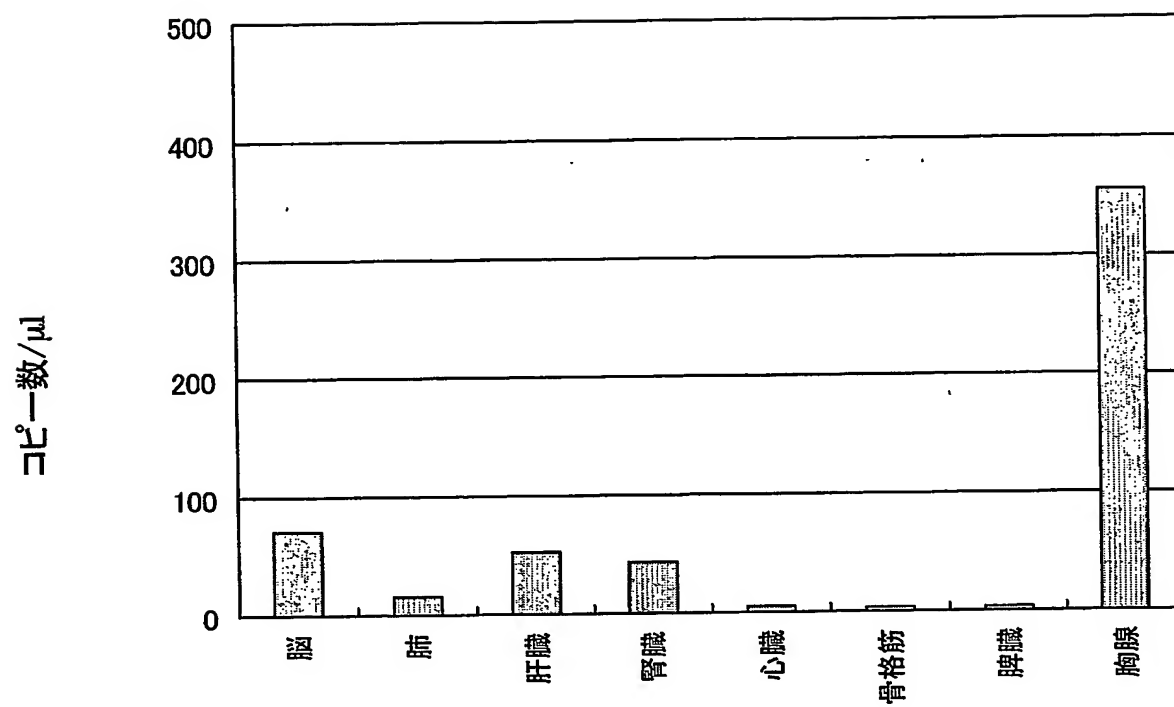


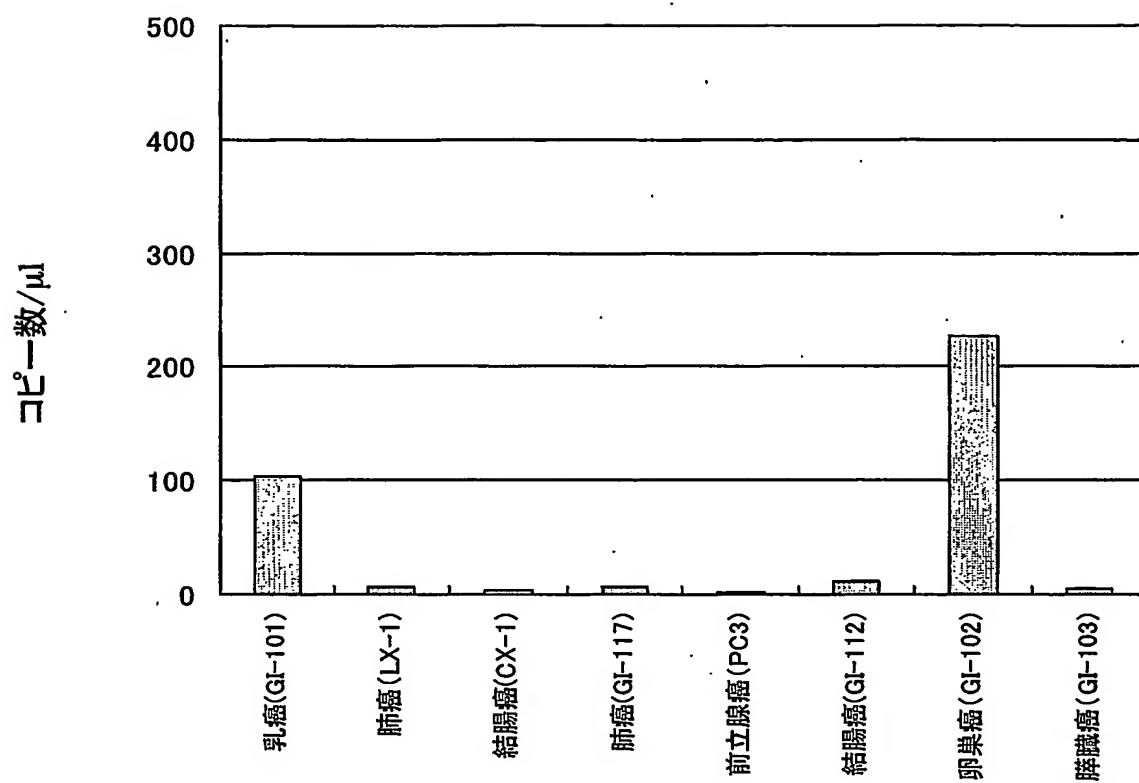
図 4





5/33

図 5



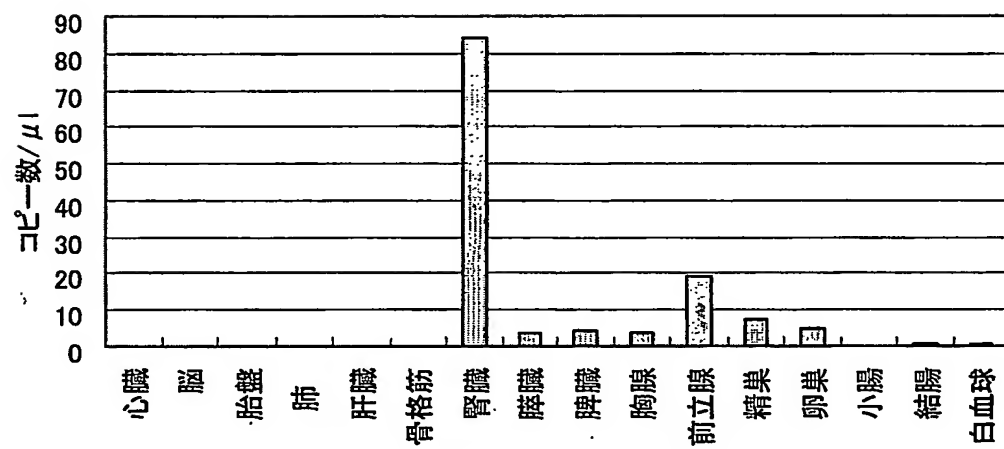
6/33

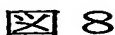
6

		TM1	
TCH234	MALQMFVTYSPWNC-----LLIVALEQSEASSDLNESANSTAYASNAWFAASSE-----	54	
ratNHE4	MGPAMLRAPFSWKWL-----LLIMVITCLEASSYVNESSSPAGQTPDARFAASSDE-----D	54	
humanNHE2	MEF-----LGNWRSRAPLPMLLLLLQVAGPVGAAETLLNAPRAMGTSSSPSPASVVPAGTTLFEE	65	
		TM2	TM3
TCH234	EGISVFELDYDYVQIPYEVTLWILLASLAKIGPHLYHRLHGLMPESCILLILVGALVGGIIFGTDHKSPPV	124	
ratNHE4	ERISVFELDYDYVQIPYEVTLWILLASLAKIGPHLYHRLHGLMPESCILLILVGALVGGIIFGTHHKSPPV	124	
humanNHE2	SLLPVFTLDYFHVQIIFHITLWILLASLAKIGPHLYHRLHGLMPESCILLIMVGLLGGIIFGVBEKSPFA	135	
		TM4	TM5
TCH234	MDSSIIYFLYLLPPIVLEGGYFMPTRPFFENIGSILWWAVLGALINALGIGLSLYLICQVKAFGLGDVNL	194	
ratNHE4	MDSSIIYFLYLLPPIVLEGGYFMPTRPFFENIGSILWWAVLGALINALGIGLSLYLICQVKAFGLGDINL	194	
humanNHE2	MKTDVFFLYLLPPIVLDAGYFMPTRPFFENIGTIFPVAVGTWNSIGIGVSIIFGICQIEAFGLSDITLH	205	
		TM6	TM7
TCH234	QNLLFGSLISAVDPVAVLAVFEEARVNEQLYMMIFGEALLNDGITVVLNMLIAFTKMHKFEDIEVDII	264	
ratNHE4	QNLLFGSLISAVDPVAVLAVFEEARVNEQLYMMIFGEALLNDGISVVLNMLIAFTKMHKFEDIEAVDII	264	
humanNHE2	QNLLFGSLISAVDPVAVLAVFENIHVNEQLYILVFGESLLNDAVTVVLNLFKSCQMK---TETIDV	272	
		TM8	TM9
TCH234	AGCAREIVVGLGGVLFVFGFISAFITRFTQNISAIEPLIVFMFSYLSYLAETLYLSGILAITACAVT	334	
ratNHE4	AGCAREIVVCGGGVFFGIIFGFISAFITRFTQNISAIEPLIVFMFSYLSYLAETLYLSGILAITACAVT	334	
humanNHE2	AGIANFFVVGIGGVIIIGFLGFIAETTRFTENIRVIEPLFVFLYSYLSYITAEFHLSGIMAITACAMT	342	
		TM10	TM11
TCH234	MKKYVEENVQSQTSYTTIKYFMKMLSSVSETLPIFIMGVSTVGKNHEWNWAFICFTLAFPCQIWRRAISVFA	404	
ratNHE4	MKKYVEENVQSQTSYTTIKYFMKMLSSVSETLPIFIMGVSTVGKNHEWNWAFVCFTLAFPCQIWRRAISVFT	404	
humanNHE2	MKKYVEENVQSQTSYTTIKYFMKMLSSVSETLPIFIMGVSTVGKNHEWNWAFVCFTLAFCLMWRRLGVFV	412	
		TM12	TM13
TCH234	FYISNQFRTPFFSIKDQCIIFYSGVRGAGSFSLAFLPLSLFPRKRMFVTATLVVIYFTVFIIQGITVGPL	474	
ratNHE4	FYVSNQFRTPFFSIKDQLIIFYSGVRGAGSFSLAFLPLTLFPRKKLFVTATLVVIYFTVFIIQGITIGPL	474	
humanNHE2	TQVINRFRITELTFKDOFTIANGGLRGAICFALVFLFAAVFPRKKLITAAIVVIFTVFILGITIRPI	482	
TCH234	VRYLDVKKTNKKE-SINEELHIRLMDHLKAGIEDVCGHWSHYQVRDKPKKFDHRYLRKILIRKNLPKSSI	543	
ratNHE4	VRYLDVRKTNKKE-SINEELHIRLMDHLKAGIEDVCGHWSHYQVRDKPKKFDHRYLRKILIRKNLPKSSI	543	
humanNHE2	VEFLDVRSNKKQAVSEIYCRIPDEVTGTIEDVCGHWHNFWRDKPKKFDKYLKLLIRENQPKSSI	552	
TCH234	VSLYKKLEMKQAIEMVETGILSSAFSIEHQAQRIQGIKRLSPEDVESIRDILTSNMYQVRQRTLSYNKY	613	
ratNHE4	VSLYKKLEMKQAIEMAETGLSSVASPTFYCSERIQGIKRLSPEDVESMRDILTRNMYQVRQRTLSYNKY	613	
humanNHE2	VSLYKKLEIKHAIEMAETGMISTVPTFASLNDCEEKIRKVTSSSETDEIFELISRLYCIQRTLSYNRH	622	
TCH234	NLKPOTSEKQAKEILIRRQNTLRESMRKGHSPLWGPAGTKNIRYLSYPYGNPQSAQ-EDTRAAGFSDDD	682	
ratNHE4	NLKPOTSEKQAKEILIRRQNTLRESLRKGSPLWGPAGTKNIRYLSFPYSNPQPAR-EGARAA-----ES	678	
humanNHE2	STTADTSEKQAKEILIRRHSLRESIRKDSINREHRSSTSRYLSLHKNTKLEKLQKRRTISIAIGN	692	
TCH234	SSDFGSPSIFFSACSRIGSLCKQEQEIIEMKSLHRGRKAFSFGYQRNTSQEYTG-----G	739	
ratNHE4	TCNE-----CCWL-----LH-----F	690	
humanNHE2	SSDSDADAGTT-----VLNLQPR-ARRFLREQFSKSKSPQSYKMEWKNEVDVDSGRDMPSTPPTPHSREK	756	
TCH234	VRRVAIRPKPIFHAVDEEGESGGE-SEGKASLVEVRSRTADHGHSDHHRSHSPLLQKK	798	
ratNHE4	-----LCRAM-----VEKINGPG-----GQETQPRLLCRNLN	717	
humanNHE2	TQTSGLLQQLLSKDQSGSEREDSLTEGIPPKPPPLVWRASEPGRKARFGSEK-----P	812	

7/33

図 7





1 M S R A T S V G D Q L E A P A E G Y E K T D D V S E K T S L A D Q E E V R I I Y L N Q S H L N K F C D N R I S T A K Y S mATP8A2  
1 M P T M R R T V S E I R S R A E G Y E K T D D V S E K T S L A D Q E E V R T I I F I N Q P Q L L T K F C N N H V S T A K Y N A T P 8 A 1  
1 M S R A T S V G D Q L E A P A E G Y E K T D D V S E K T S L A D Q E E V R T I I Y L N Q P H L L N K F R D N Q I S T A K Y S T C H 2 1 2

40 V L T F L P R F L Y E Q I R R R A A N A F F L F I A L L Q Q I P D V S P T G R Y T T L V P L V I I L T I A G I K E I I E D mATP8A2  
61 I I T F L P R F L Y E Q F R R R A A N S F F L F I A L L Q Q I P D V S P T G R Y T T L V P L L F F I L A V A A I K E I I E D A T P 8 A 1  
40 V L T F L P R F L Y E Q I R R R A A N A F F L F I A L L Q Q I P D V S P T G R Y T T L V P L I I I L T I A G I K E I V E D T C H 2 1 2

100 F K R H K A D N A V N K K K T I V L R N G M M H T I M W K E V A V G D I V K V L N G Q Y L P A D M V L F S S S E P Q G M mATP8A2  
121 I K R H K A D N A V N K K K T Q V L R N G A M E I V H W E K V A V G E I V K V T N G E H L P A D L I S L S S S E P Q A M A T P 8 A 1  
100 F K R H K A D N A V N K K K T I V L R N G M M H T I M W K E V A V G D I V K V V N G Q Y L P A D V V L L S S S E P Q A M T C H 2 1 2

160 C Y V E T A N L D G E T N L K I R Q G L S H T T D M Q T R D V L M K L S G R I E C E G P N R H L Y D F T G N L H L D G K mATP8A2  
181 C Y I E T S N L D G E T N L K I R Q G L P A T S D I K D V D S L M R I S G R I E C E S P N R H L Y D F V G N I R L D G H A T P 8 A 1  
160 C Y V E T A N L D G E T N L K I R Q G L S H T A D M Q T R E V L M K L S G T I E C E G P N R H L Y D F T G N L N L D G K T C H 2 1 2

220 S S V A L G P D Q I L L R G T Q L R N T Q W V F G V V V Y T G H D S K L M Q N S T K A P L K R S N V E K V T N V Q I L V mATP8A2  
241 G T V P L G A D Q I L L R G A Q L R N T Q W V H G I V V Y T G H D T K L M Q N S T S P P L K L S N V E R I T N V Q I L I A T P 8 A 1  
220 S L V A L G P D Q I L L R G T Q L R N T Q W V F G I V V Y T G H D T K L M Q N S T K A P L K R S N V E K V T N V Q I L V T C H 2 1 2

280 L F G I L L V M A L V S S V G A L F W N G S H G G K S W Y I K K M D T N S D N F G Y N L L T F I I L Y N N L I P I S L L mATP8A2  
301 L F C I L I A M S L V C S V G S A I W N R R H S G K D W Y L N L N Y G G A S N F G L N F L T F I I L F N N L I P I S L L A T P 8 A 1  
280 L F G I L L V M A L V S S A G A L Y W N R S H G E K N W Y I K K M D T T S D N F G Y N L L T F I I L Y N N L I P I S L L T C H 2 1 2

340 V T L E V V K Y T Q A L F I N W D M D M Y Y I E N D T P A M A R T S N L N E E L G Q V K Y L F S D K T G T L T C N I M N mATP8A2  
361 V T L E V V K Y T Q A Y F I N W D L D M H Y E P T D T A A M A R T S N L N E E L G Q V K Y I F S D K T G T L T C N V M Q A T P 8 A 1  
340 V T L E V V K Y T Q A L F I N W D T D M Y Y I G N D T P A M A R T S N L N E E L G Q V K Y L F S D K T G T L T C N I M N T C H 2 1 2

9/33

X 9

400 FKKCSIAGV TYGHFPPELAREQSSDDF-C ---RMTSCTNDSCDFFNDPRL LKN IEDQHPTA MATP8A2  
421 FKKCTIAGVAYGHVPE---PEDYGCSPDEWQNSQFGDEKTFSDSSLLLENLQNNHPPTA ATP8A1  
400 FKKCSIAGV TYGHFPPELAREPSSDDF-C ---RMPPPCS DSCDFFDDPRL LKN IEDRRHPPTA TCH212

455 FCIQEFLT LLA VCHT V VPEKGDDEI IYQA SSPDEA ALVKGA KKLGFVFTGRTPY SVII IEA MATP8A2  
475 FIIICEFLT MM AVCHT A VPEREGDKK IYQA ASPDEG ALVRAAKQLNFVFTGRTPD SVII IDS ATP8A1  
455 FCIQEFLT LLA VCHT V VPEKGDN IYQA SSPDEA ALVKGA KKLGFVFTGRTPF SVII IEA TCH212

515 MGQEQTFG ILNVLEFS SDRKRMSVIVR LPSGQLRLYCKKGAD NVIFERLSKDSKY MEETLC MATP8A2  
535 LGQEERYEL LNVLEF TSARKRMSVIVR TTPSGKLRLYCKKGAD TVIYDRRLAETSKY KEITLK ATP8A1  
515 MGQEQTFG ILNVLEFS SDRKRMSVIVR TTPSGRLRLYCKKGAD NVIFERLSKDSKY MEETLC TCH212

575 HLEYFATEGLR TL CVA YA DLS ENE YE EEW LKVYQ EAS IILKDR AQRL EE C YE IIEKNL LLL MATP8A2  
595 HLEYFATEGLR TL CVA YA DLS ENE YE EEW LKVYQ EAS IILKDR AQRL EE C YE IIEKNL LLL ATP8A1  
575 HLEYFATEGLR TL CVA YA DLS ENE YE EEW LKVYQ EAS IILKDR AQRL EE C YE IIEKNL LLL TCH212

635 GATAIED RLQ AGVPET I A TL LKAE I KIW VLTGDKKQETA INIG YSCRL V SQNM AL ILLKE D MATP8A2  
655 GATAIED RLQ AGVPET I A TL LKAE I KIW ILLTGDKKQETA INIG YSCRL V SQNM AL ILLKE G ATP8A1  
635 GATAIED RLQ AGVPET I A TL LKAE I KIW VLTGDKKQETA INIG YSCRL V SQNM AL ILLKE D TCH212

695 SLDATRAA ITQHCT D LGNLL GKEND VALIIDG HTLKYAL SF EVRRSFLDLALSC KAVICC MATP8A2  
715 SLDGTR ETL SRHCT T LGDALL RKEND FALIIDG KTLKYAL TFFGVRRQYFLDLALSC KAVICC ATP8A1  
695 SLDATRAA ITQHCT D LGNLL GKEND VALIIDG HTLKYAL SF EVRRSFLDLALSC KAVICC TCH212

755 RVSPLOKSEI V DVVKK RVKA ITLAIGDGGANDV GM IQTAHVGVGISGNEG M QA TN NSDY AI MATP8A2  
775 RVSPLOKSEI V DVVKK RVKA ITLAIGDGGANDV GM IQTAHVGVGISGNEG M QA TN NSDY SI ATP8A1  
755 RVSPLOKSEI V DVVKK RVKA ITLAIGDGGANDV GM IQTAHVGVGISGNEG M QA TN NSDY AI TCH212

10/33

1 O

815 A Q F S Y L E K L L L V H G A W S Y N R V T K C I L Y C F Y K N V V L Y I I E L W F A F V N G F S G Q I L F E R W C I G mATP8A2  
835 A Q F K Y L K N L L M I H G A W N Y N R V S K C I L Y C F Y K N I V L Y I I E I W F A F V N G F S G Q I L F E R W C I G ATP8A1  
815 A Q F S Y L E K L L L V H G A W S Y N R V T K C I L Y C F Y K N V V L Y I I E L W F A F V N G F S G Q I L F E R W C I G TCH212

875 L Y N V I F T A L P P F T L G I F E R S C T Q E S M L R F P Q L Y R I T Q N A E G F N T K V F W G H C I N A L V H S L I mATP8A2  
895 L Y N V M F T A M P P L T L G I F E R S C R K E N M L K Y P E L Y K T S Q N A L D F N T K V F W V H C L N G L F H S V I ATP8A1  
875 L Y N V I F T A L P P F T L G I F E R S C T Q E S M L R F P Q L Y K I T Q N G E G F N T K V F W G H C I N A L V H S L I TCH212

935 L F W V P M K A L E H D T P V T S G H A T D Y L F V G N I V Y T Y V V T V C L K A G L E T T A W T K F S H L A V W G S mATP8A2  
955 L F W F P L K A L Q Y G T A F G N G K T S D Y L L L G N F V Y T F V V I T V C L K A G L E T S Y W T W F S H I A I W G S ATP8A1  
935 L F W F P M K A L E H D T V L T S G H A T D Y L F V G N I V Y T Y V V T V C L K A G L E T T A W T K F S H L A V W G S TCH212

995 M L I W L V F F G V Y S T I W P T I P I A P D M K K G Q A T M V L S S A Y F W L G L F L V P T A C L I E D V A W R A A K H mATP8A2  
1015 I A L W V V F F G I Y S S L W P A I P M A P D M S G E A A M L F S S G V F W M G L L F I P V A S L L L D V V Y K V I K R R ATP8A1  
995 M L T W L V F F G I Y S T I W P T I P I A P D M R R G Q A T M V L S S A H F W L G L F L V P T A C L I E D V A W R A A K H TCH212

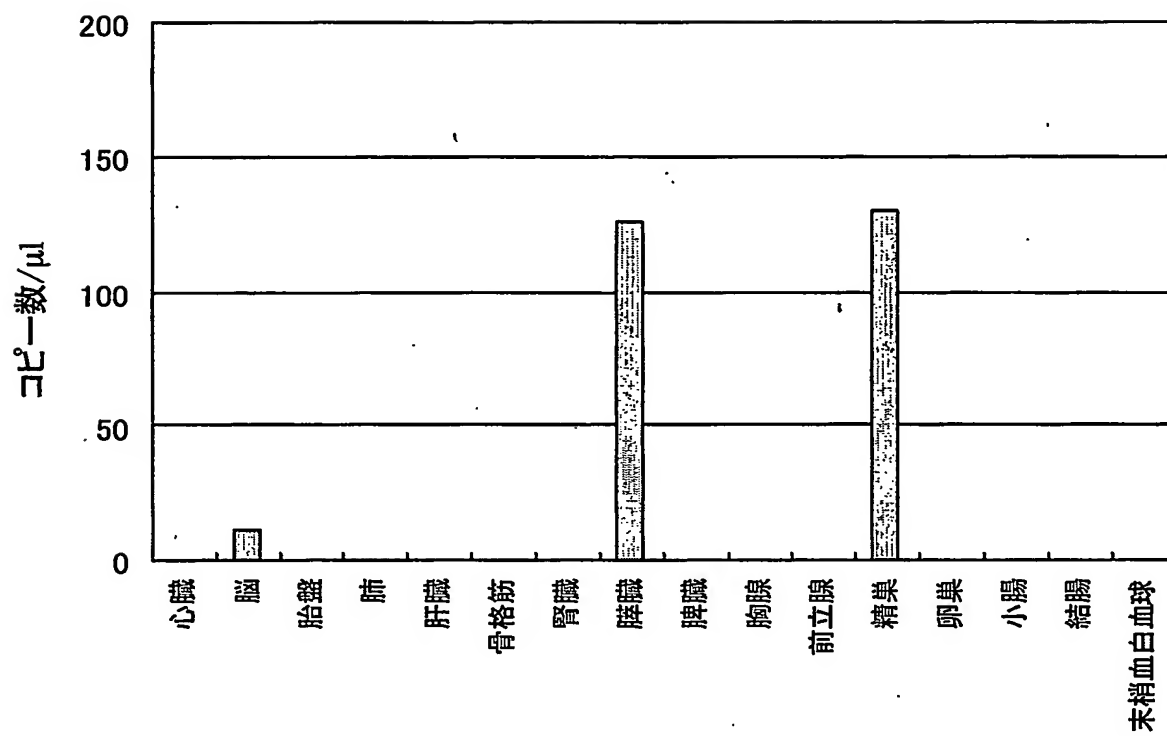
1055 T C K K T L L E E V Q E L E T K S R V M G K A M L R D S N G K R M N E R D R L I K R R L S R K T P P T L F R T G S I Q Q C mATP8A2  
1075 T A F K T L L D E V Q E L E A K S Q D P G A V V L - - - G K S L T E R A Q L L K N V F K K N H V N L Y R S E S L Q Q N ATP8A1  
1055 T C K K T L L E E V Q E L E T K S R V L G K A V L R D S N G K R L N E R D R L I K R R L G R K T P P T L F R G S S L Q Q G TCH212

1115 V S H G Y A F S Q E E H G A V T Q E E I V R A Y D T T K E N S R K K  
1131 L L H G Y A F S Q D E N G I V S Q S E I V R A Y D T T K Q R P D E W  
1115 V P H G Y A F S Q E E H G A V S Q E E I V R A Y D T T K K K S R K K

TM5  
TM6  
TM7  
TM8  
TM9  
TM10

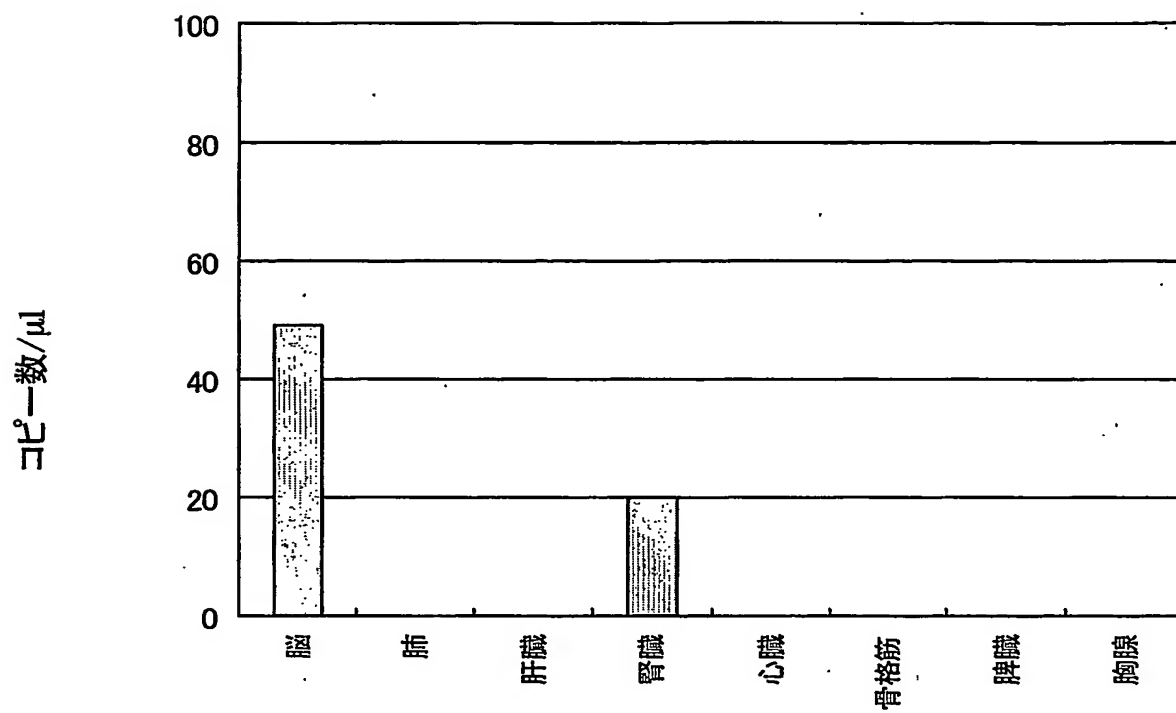
11/33

☒ 1 1



12/33

図 1. 2





1 [MK]KWSSTD LGAAADPLQKDTCPDPLD [GD]PNSRP PPAKPQLSTA [K]SRTR hVR1  
1 [MK]AHPKEMVPLMGKRVAAPS - - - - - [GN]PAVL [P]EKRPAEITPT [K]KSAH TCH200

49 [L]F - - - - - GKGDSEEA [FV]DCPHEEGELDS [C]PTITVSPVITIT [Q]R [F]G hVR1  
43 [F]F [L]EIEGFEPNPTVAKTSP [FV]FSKPMDSNIRQ [C]ISGNCDDMDSP [Q]S [P]Q TCH200

89 [D]GPTGARLLSQDSV [A]ASTEKT [R]LYDRR - - - S [I]FE [AV]AQNNCQD [L]ES [L] hVR1  
91 [D]DV [T]ETPSNPNSPS [A]QLAKEEQ [R]RKKRR [L]KKR [I]FA [AV]SEGCVEEL [V]E [L] TCH200

134 [L]LF [L]QK - - SKKH [L]TD - - - - - NEFKDPE [T]GKTCL [L]KAM [L]N [L]HDGQNTT hVR1  
139 [L]VE [L]QELCRRR [H]DE [D]VPDFLMHKLTA [S]D [T]GKTCL [M]KAL [L]N [L]INPNTKEI TCH200

174 [I]PL [L]LE [I]A [R]QT [D]SL [K]ELV [N]A [S]YT [D]SY [Y]K [G]QTAL [H]IAIERR [N]MALVT [L]L hVR1  
187 [V]RI [L]LAF [A]EEND [I]LGRFI [N]A [E]YT [E]EAY [E]GQTAL [N]IAIERR [Q]GDI [A]AL [L] TCH200

222 [V]EN [G]ADV [Q]AA [A]H [G]D [F]F [K]KT [K]GRP [G]FY [F]GE [L]PL [S]LA [A]CTNQ [L]G [I]V [K]FL [L] hVR1  
235 [I]AA [G]ADV [N]AH [A]K [G]A [F]FN [P]KY [Q]HE [G]FY [F]GE [T]PL [A]LA [A]CTNQ [P]E [I]V [Q]L [L]M TCH200

270 [Q]NSWQTAD [I]SA [R]DS [V]GN [T]V [L]HALV [E]VADNTADNTK [F]V [T]S [M]YNE [I]L [I]LG hVR1  
283 [E]H - - EQT [D]ITS [R]DS [R]GN [N]I [L]HALV [T]VAEDFKTQND [F]V [K]RM [Y]DM [I]L [L]RS TCH200

318 [A]KLHPTLK [L]E [E]LT [N]KK [G]MM [P]LA [L]AAG [T]GK [I]GV [L]AYIL [Q]REI [Q]E [P]ECR [R]H hVR1  
329 [G]NWE - - - [L]ETTR [N]ND [G]LT [P]L [Q]LA [A]KM [G]KA [E]IL [K]YIL [S]REI [K]E [K]RL [R]S TCH200

366 [L]SRKFT [E]WAYGPV [H]SSLYDL [S]CI [D]TCEK [N]SVLE [V]IA [Y]SSSET [P]NR [H]DM hVR1  
373 [L]SRKFT [D]WAYGPV [S]SSLYDL [T]NV [D]TTD [N]SVLE [I]TV [Y]NTNID - [NR]HE [M] TCH200

414 [L]LV [E]PLNR [L]LQDKW [D]RF [V]KR [I]FY [F]NF [L]V [Y]CL [Y]M [I]IF [T]MAA [Y]YRP [V]DGL hVR1  
420 [L]TL [E]PLHT [L]LHM [K]W [K]KF [A]K [H]MF [F]LS [F]CF [Y]FF [Y]N [I]TL [L]S [Y]YRP [R]EE - TCH200

462 [P]PFKM [E]KTGDYFRV [T]GEI - - [L]SV [L]G [G]VYFFF - - - - - R [G]I [Q]YFL [Q]R hVR1  
467 - - - - - [E]AIPHPLAL [T]HKMGWL [Q]L [L]G [R]MFVLIWAMCISVKE [G]I [A]IF [L]R TCH200

500 [R]PSMKT [L]FV [D]SYSEML [F]FL [Q]SLF [M]LAT [V]V [L]Y [F]SHL [K]EY [V]A [S]M [V]FSL [A]L hVR1  
510 [P]SD [L]Q [S]ILS [D]AWPHFV [F]FI [Q]AVLVILS [V]F [L]Y [L]FAY [K]EY [L]A [C]LV [L]AM [A]L TCH200

548 [G]WT [N]MLYYTRGFQ [Q]MG [I]YA [V]MI [E]KM [I]LR [D]LCRF [M]FVYIVFL [F]GF [S]TA [V] hVR1  
558 [G]WA [N]MLYYTRGFQ [S]MG [M]YS [V]MI [Q]KV [I]LH [D]VL [K]F [L]FVYIVFL [L]GF [G]V [A]L TCH200

596 [V]T [L]IE [D]GKN [D]SLPSESTSHRWRGP [A]C [R]PPD [S]SY [N]S [L]YSTC [L]ELFK [F]TI hVR1  
606 [A]S [L]IE [K]CPK [D]N - - - - - KD [C] - - - - - SSYG [S]FSDAV [L]ELFK [L]TI TCH200

644 [G]M [G]DL [E]FTE [N]YDFKAV [F]I [I]LL [L]A [Y]VILT [Y]I [L]LLNMLIA [L]MG [E]TV [N]KIA hVR1  
638 [G]L [G]DL [N]IQ [Q]N [S]KYPIL [F]L [F]LL [I]T [Y]VILT [F]V [L]LLNMLIA [L]MG [E]TV [E]NV [S] TCH200

692 [Q]ESKN [I]WK [L]QRA [I]TIL [D]TEK [S]FLKCM [R]KA [F]RS [G]KL [L]QV [G]YTPDGK [D]DY hVR1  
686 [K]ESER [I]WR [L]QRA [R]TIL [E]FE [K]MLPEWL [R]SR [F]RM [G]EL [C]KV [A] - - - - - ED [D]F TCH200

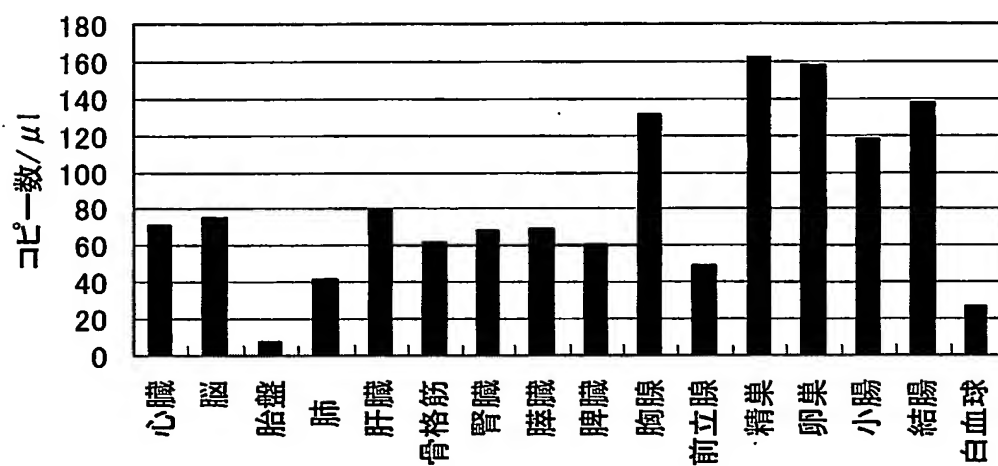
740 [R]WC [F]RV [D]EVN [W]T [T]WN [T]N [V]GI [I]NEDPG [N]CEG [V]KR [T]LS [F]SLRSSRVSGRH hVR1  
729 [R]LC [C]LR [I]N [E]VK [W]TE [W]K [T]H [V]SFL [N]EDPG [P] - - - - - VR [R]TAD [F]N - - - - - TCH200

788 [W]KNFALVPL [L]REASARD [R]QSAQPEEVY [L]RQ [F]SGSLK [P]E [D]A [E]V [F]KSPAA hVR1  
764 - - - - - KIQDSS [R]NNSKT [T] - - - - - LNA [F] - - - - - EEV [E]E [F] - - - - - PE TCH200

836 SGEK hVR1  
789 TSV. TCH200

14/33

図 1 4



1 M R A N C S S S S A C P A N S S E E E L P V G L E V H G N L E L V F T V V S T V hTCH230  
1 M S T D C A G N S T C P V N S T E E D P P V G M E G H A N L K L L F T V L S A V mTCH230

41 M M G L L M F S L G C S V E I R K L W S H I R R P W G I A V G L L C Q F G L M P hTCH230  
41 M V G L V M F S F G C S V E S Q K L W L H L R R P W G I A V G L L S Q F G L M P mTCH230

81 F T A Y L L A I S F S L K P V Q A I A V L I M G C C P G G T I S N I F T F W V D hTCH230  
81 L T A Y L L A I G F G L K P F Q A I A V L M M G S C P G G T I S N V L T F W V D mTCH230

121 G D M D L S I S M T T C S T V A A L G M M P L C I Y L Y T W S W S L Q Q N L T I hTCH230  
121 G D M D L S I S M T T C S T V A A L G M M P L C L Y I Y T R S W T L T Q N L V I mTCH230

161 P Y Q N I G I T L V C L T I P V A F G V Y V N Y R W P K Q S K I I L K I G A V V hTCH230  
161 P Y Q S I G I T L V S L V V P V A S G V Y V N Y R W P K Q A T V I L K V G A I L mTCH230

201 G G V L L L V V A V A G V V L A K G S W N S D I T L L T I S F I F P L I G H V T hTCH230  
201 G G M L L L V V A V T G M V L A K G - W N T D V T L L V I S C I F P L V G H V T mTCH230

241 G F L L A L F T H Q S W Q R C R T I S L E T G A Q N I Q M C I T M L Q L S F T A hTCH230  
240 G F L L A F L T H Q S W Q R C R T I S I E T G A Q N I Q L C I A M L Q L S F S A mTCH230

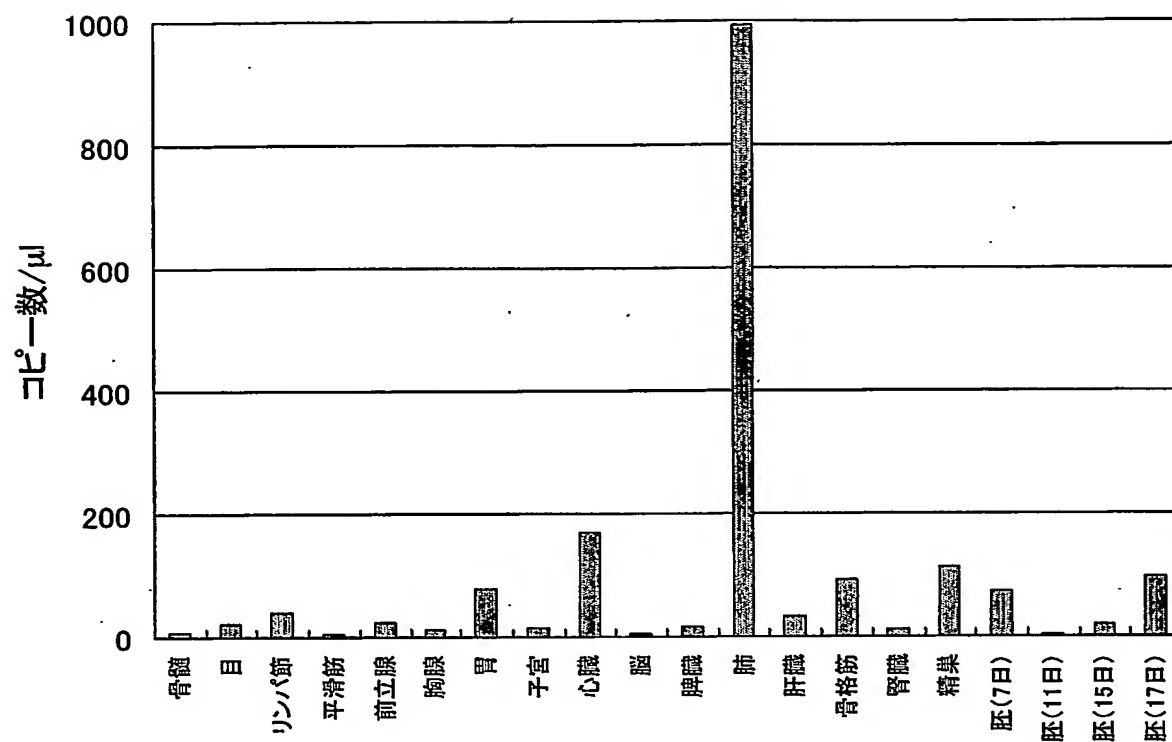
281 E H L V Q M L S F P L A Y G L F Q L I D G F L I V A A Y Q T Y K R R L K N K H G hTCH230  
280 E Y L V Q L L N F A L A Y G L F Q V L H G L L I V A A Y Q A Y K R R Q K S K C R mTCH230

321 K K N S G C T E V C H T R K S T S S R E T N A F L E V N E E G A I T P G P P G P hTCH230  
320 R Q H P D C P D V C Y E K Q P - - R E T S A F L D K G D E A A V T L G P V Q P mTCH230

361 M D C H R A L E P V G H I T S C E hTCH230  
357 E Q H H R A A E L T S H I P S C E mTCH230

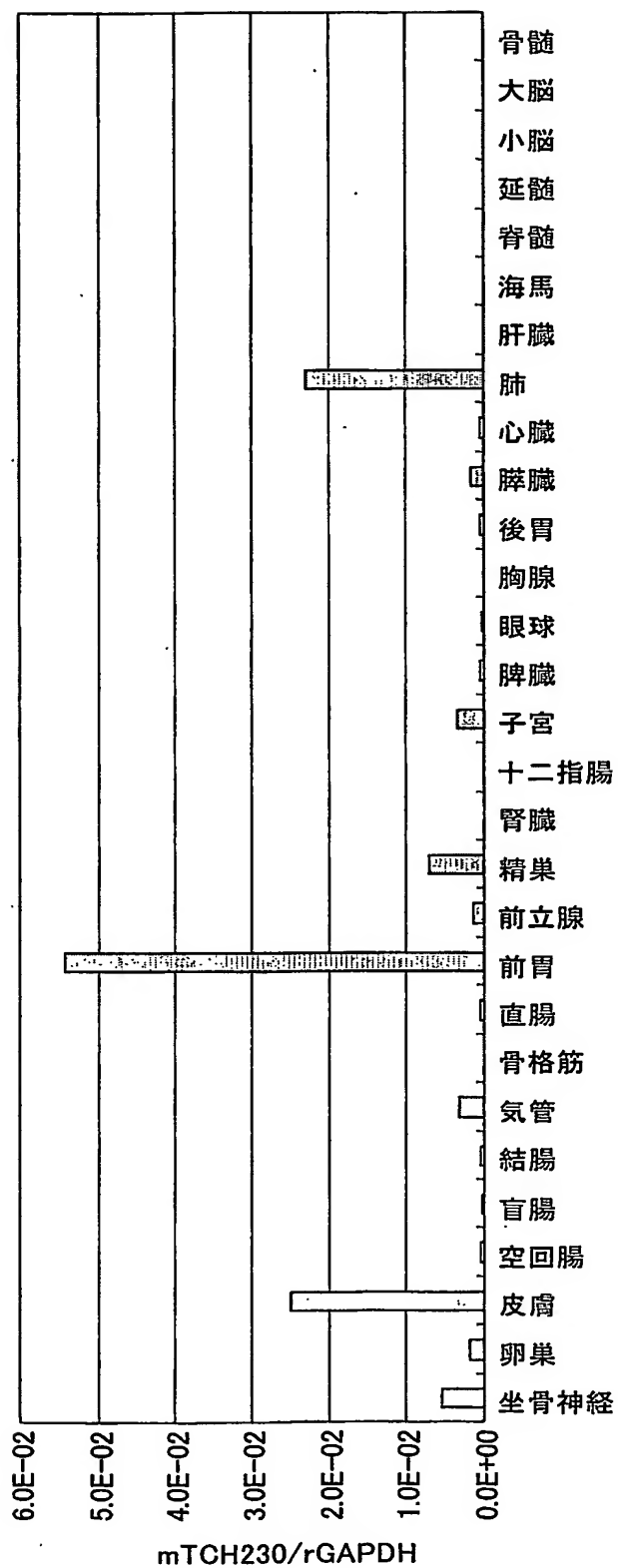
16/33

図 1 6



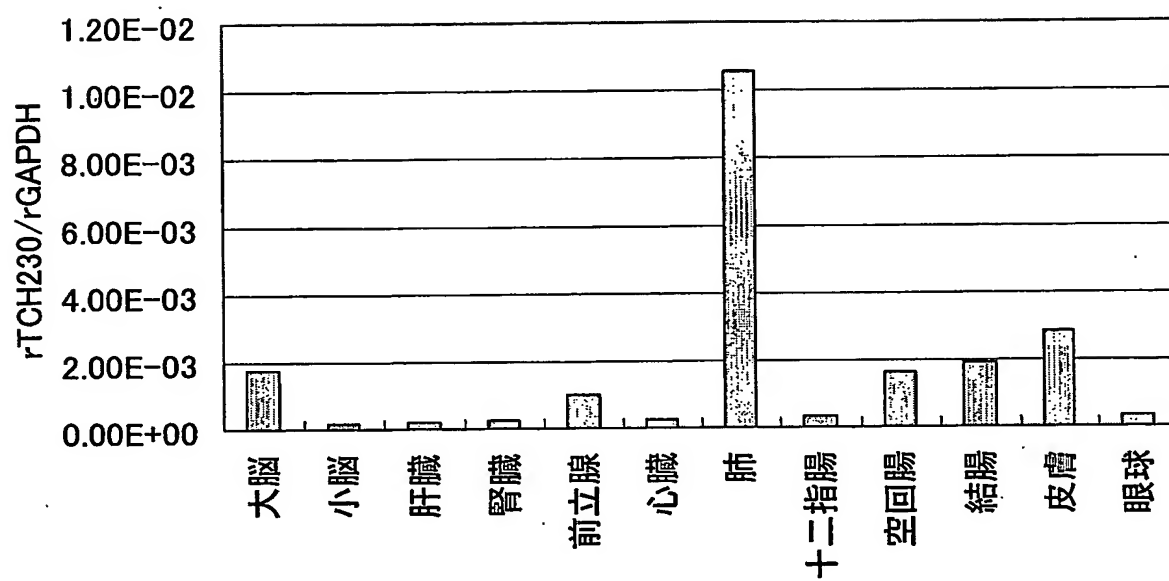
17/33

図 1 7



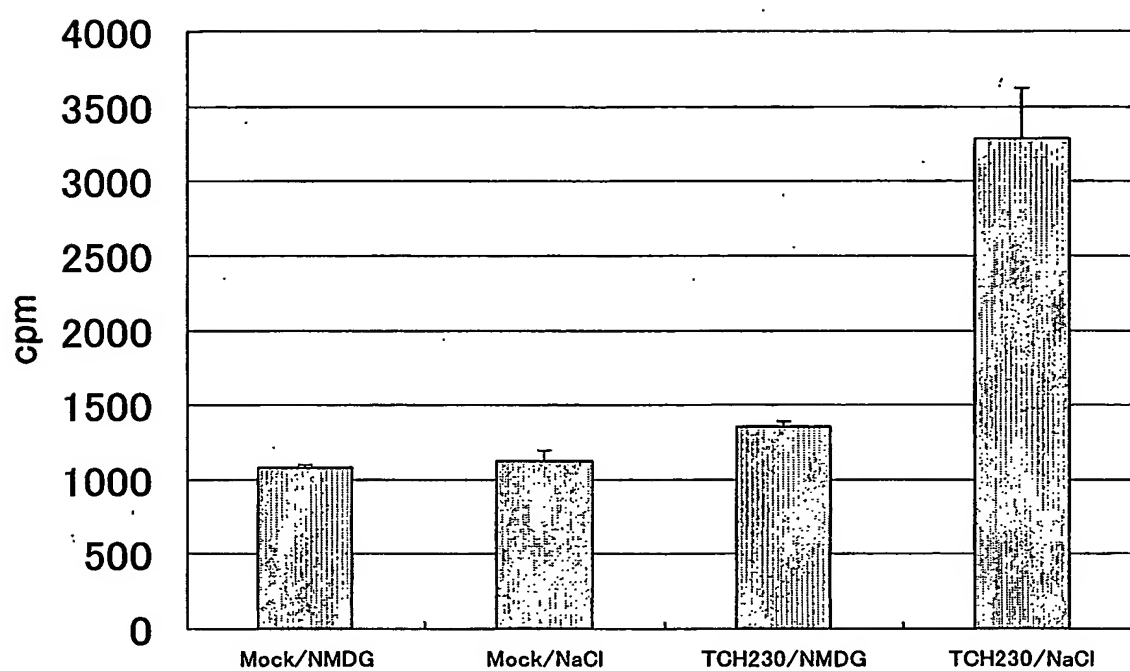
18/33

図 1 8



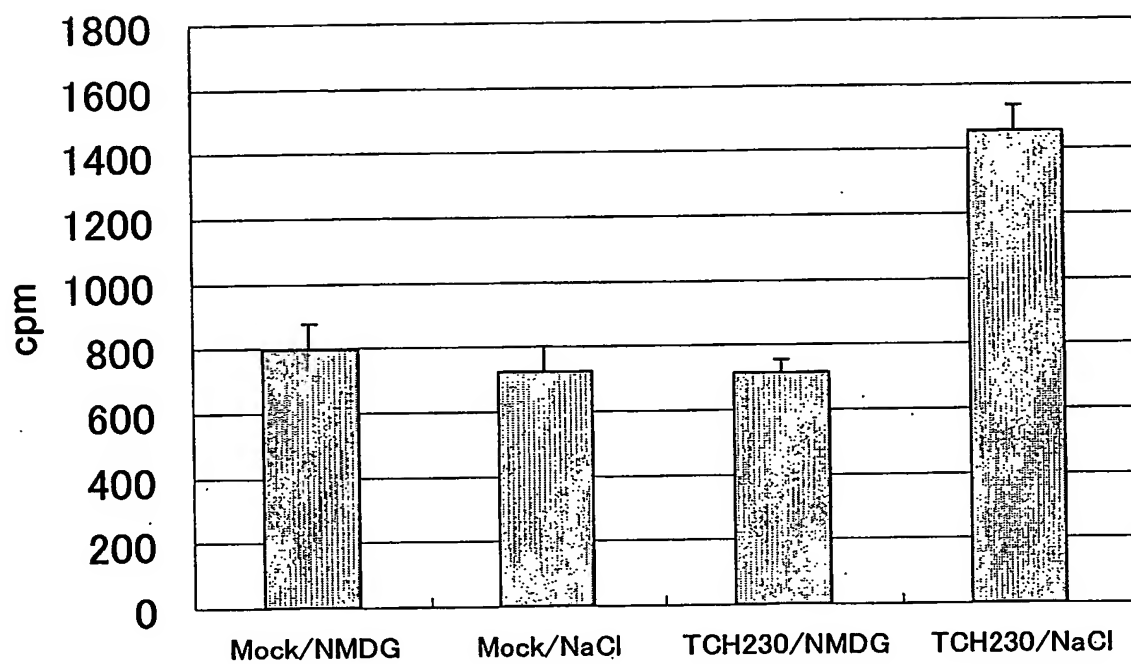
19/33

1 9



20/33

20



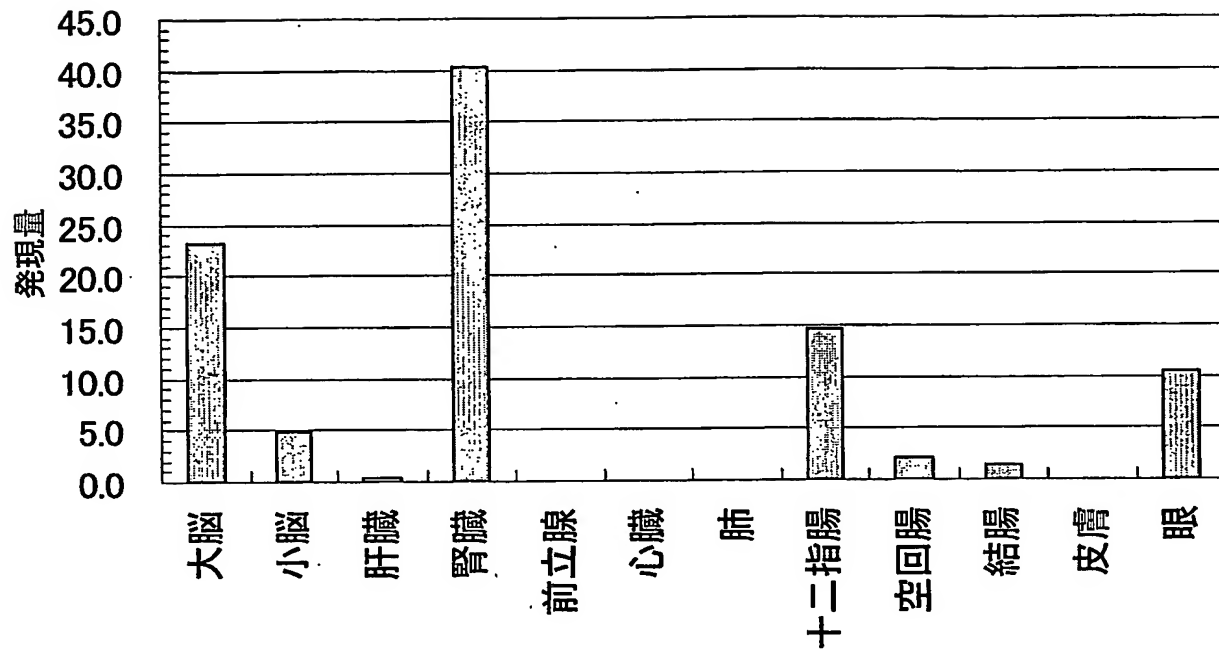


21/33

図 2 1

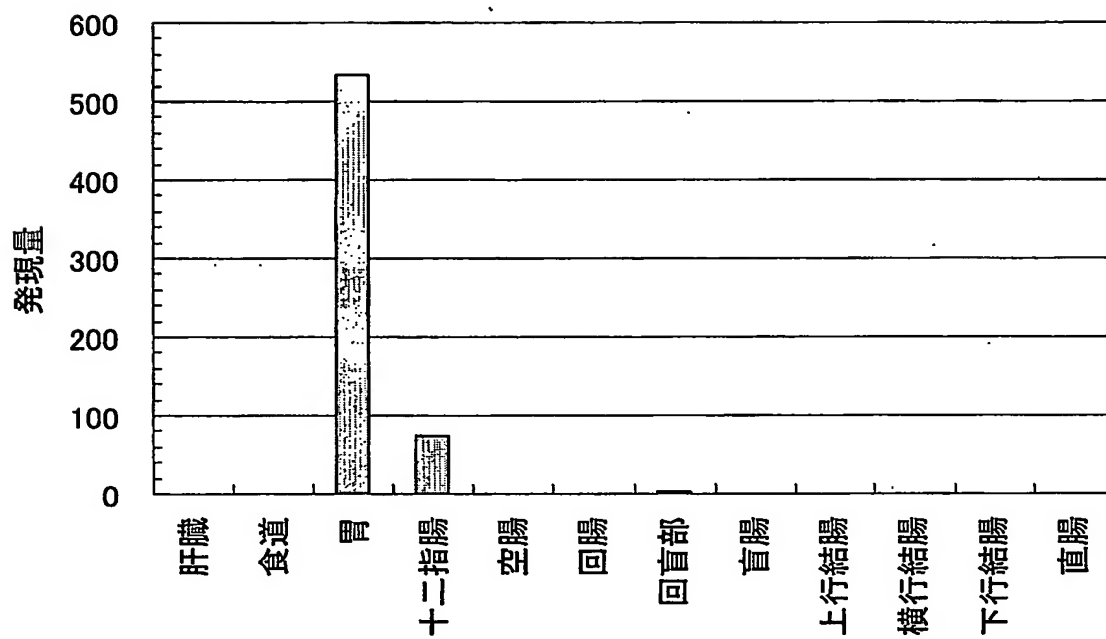


図 2 2



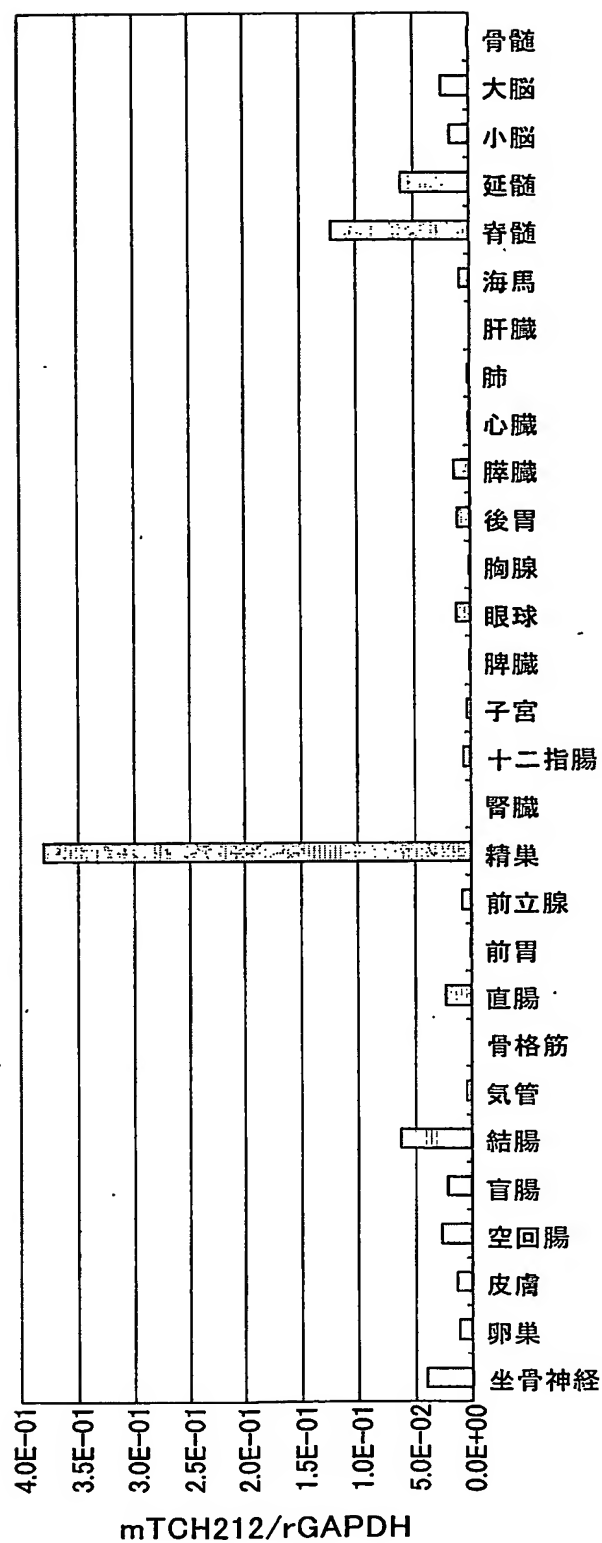
23/33

図 2 3



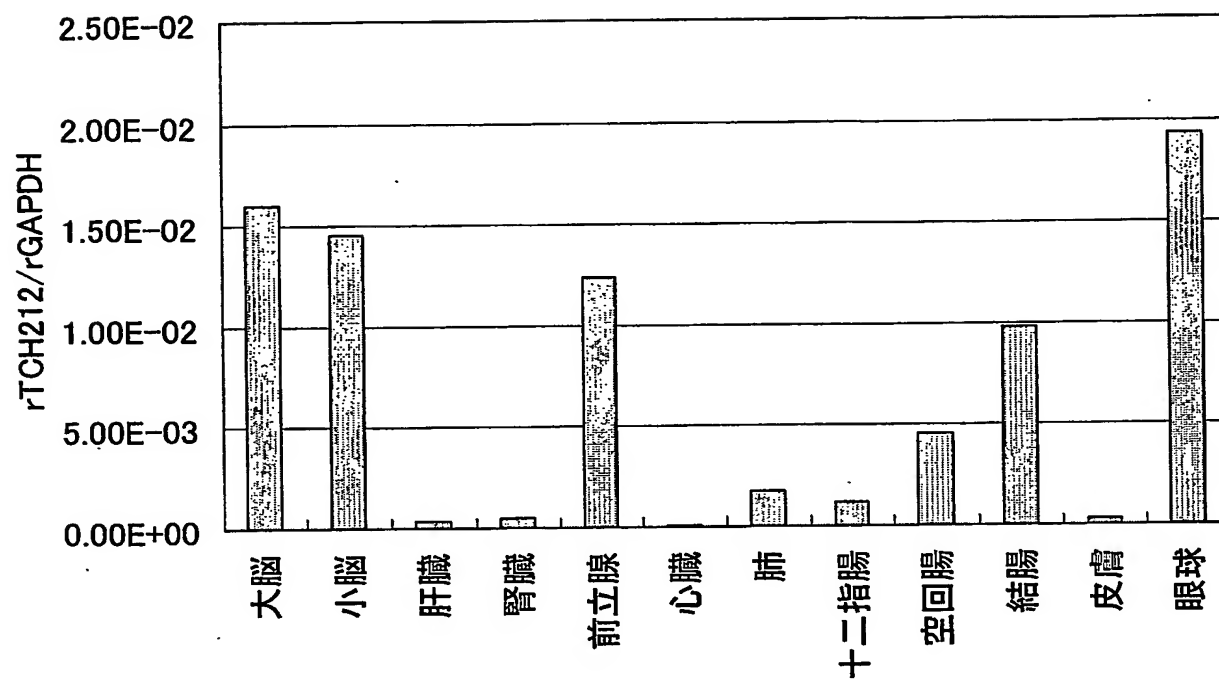
24/33

24



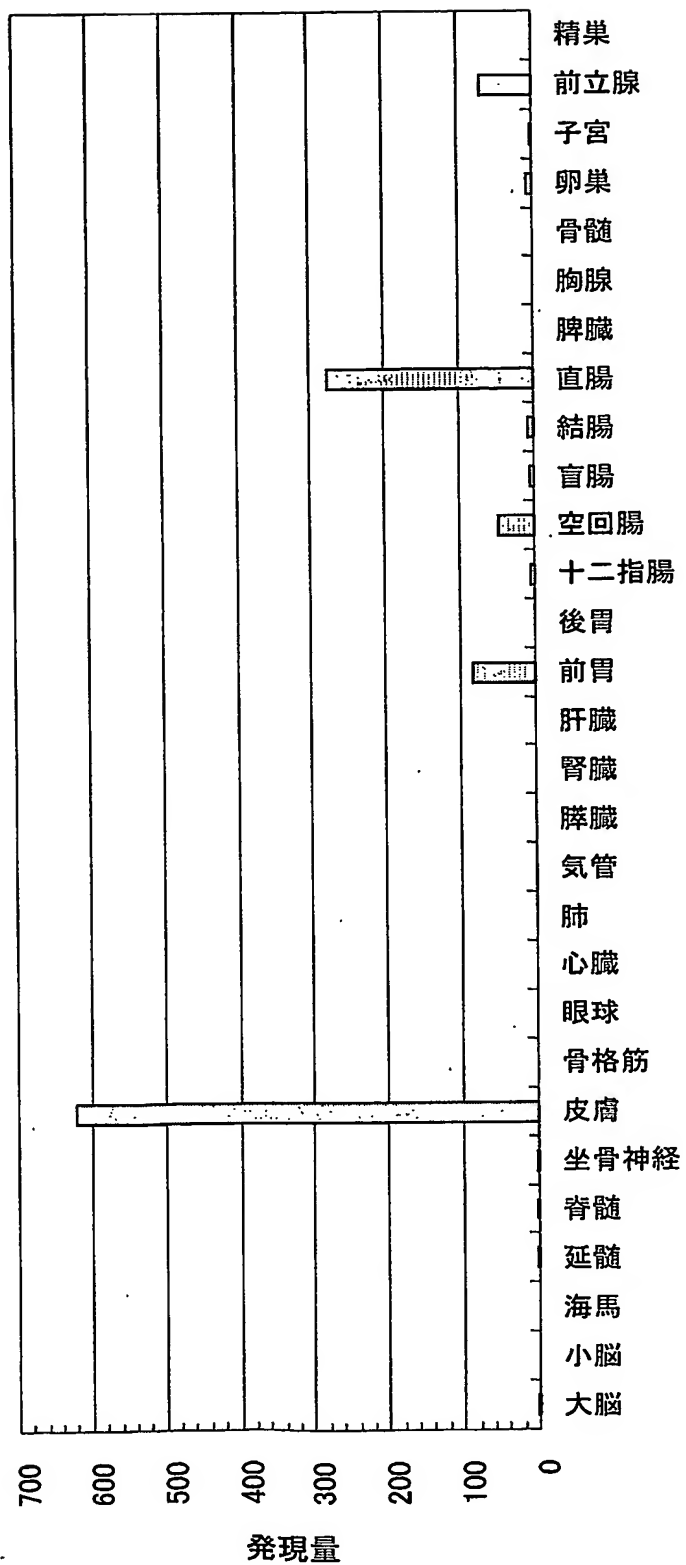
25/33

図 2 5



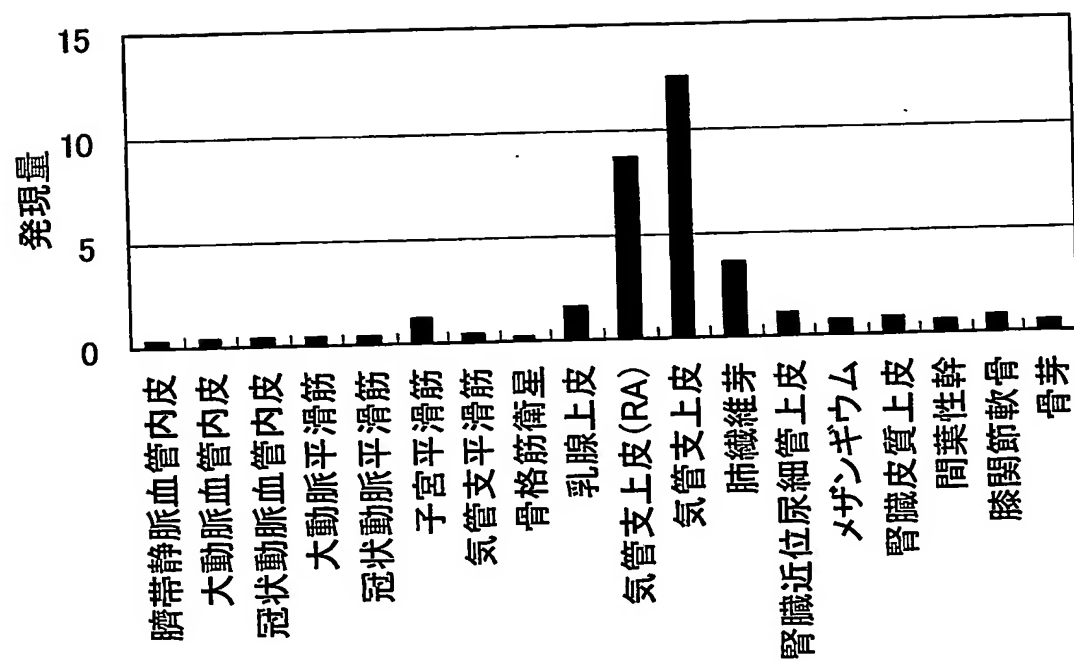
26/33

図 2 6



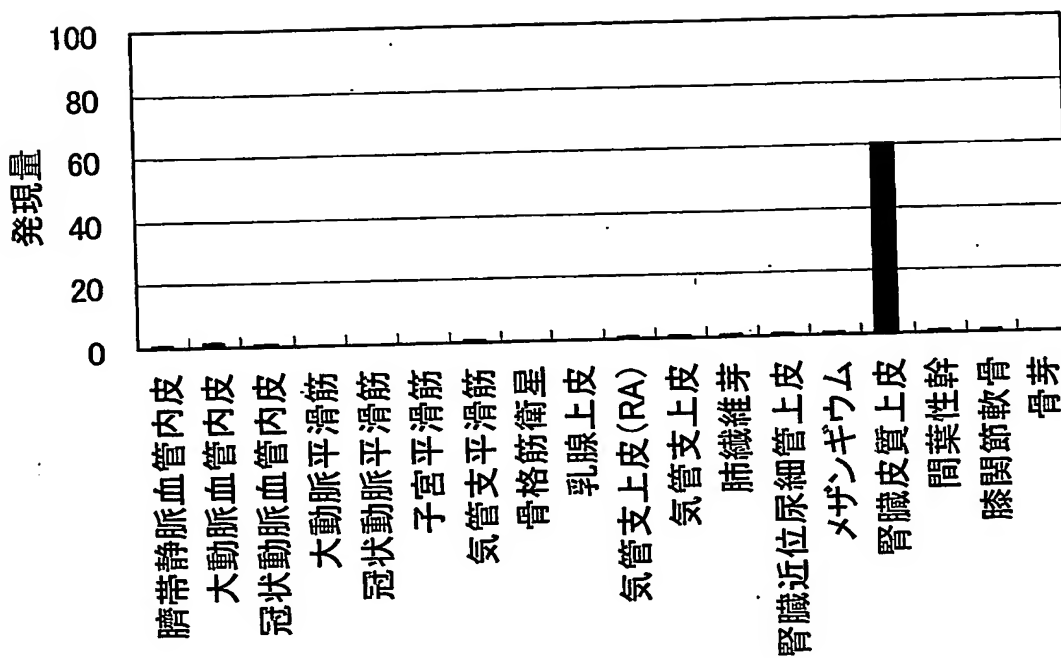
27/33

図 27



28/33

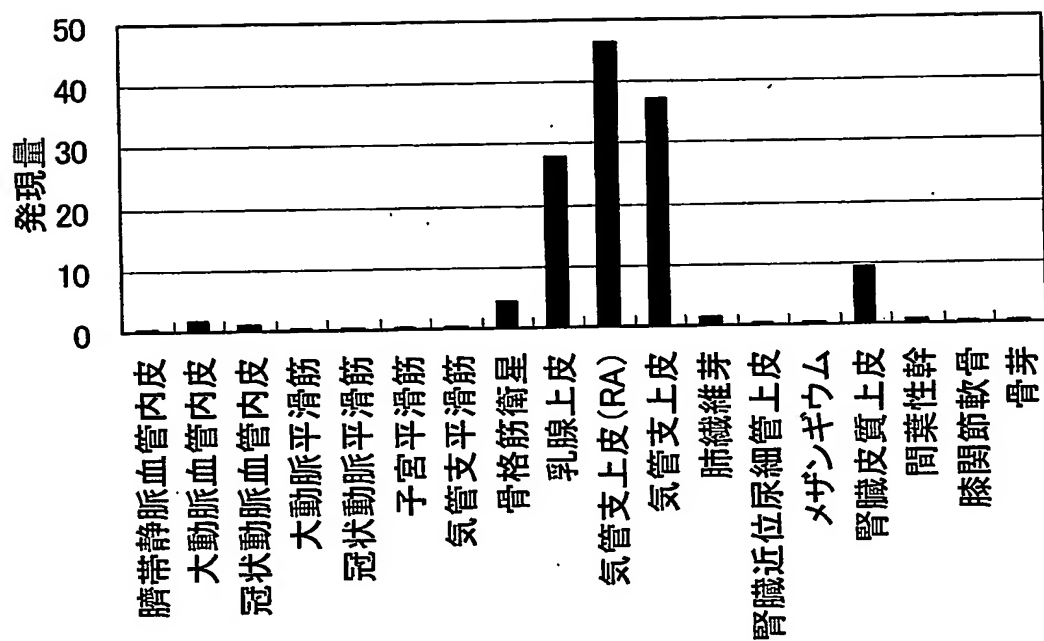
図 28





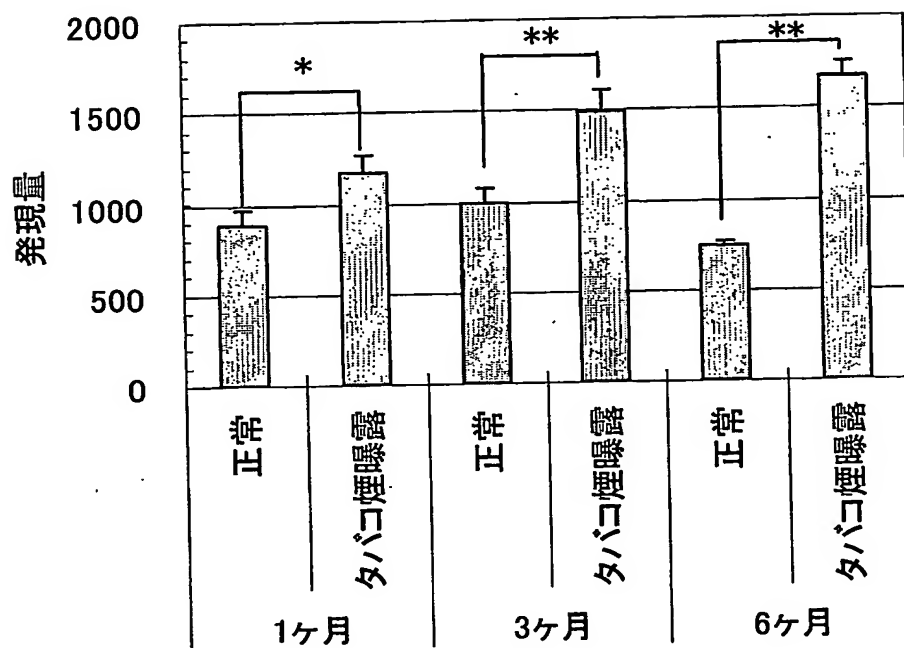
29/33

図 29



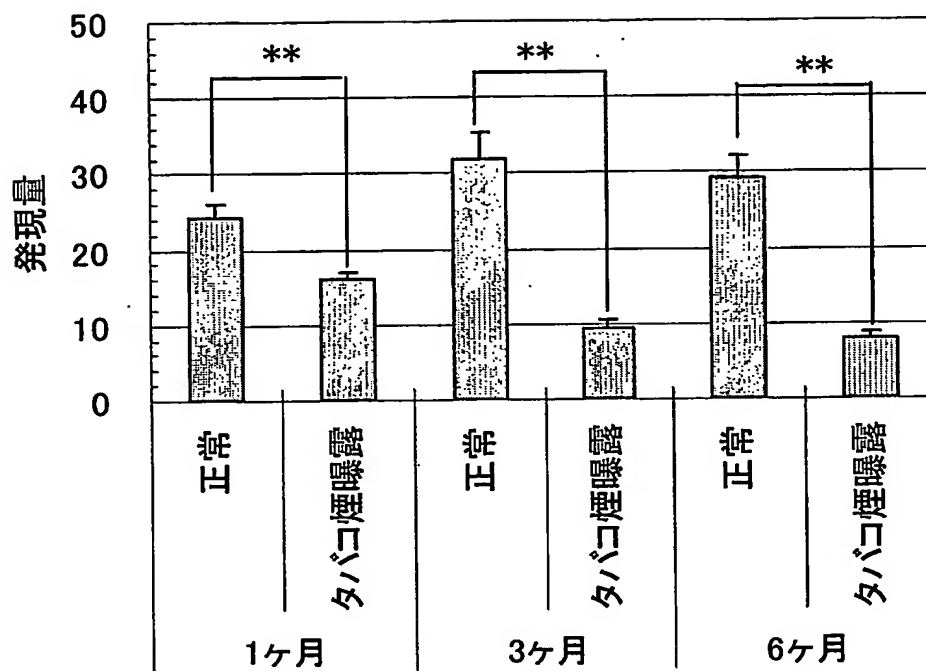
30/33

図 3 O



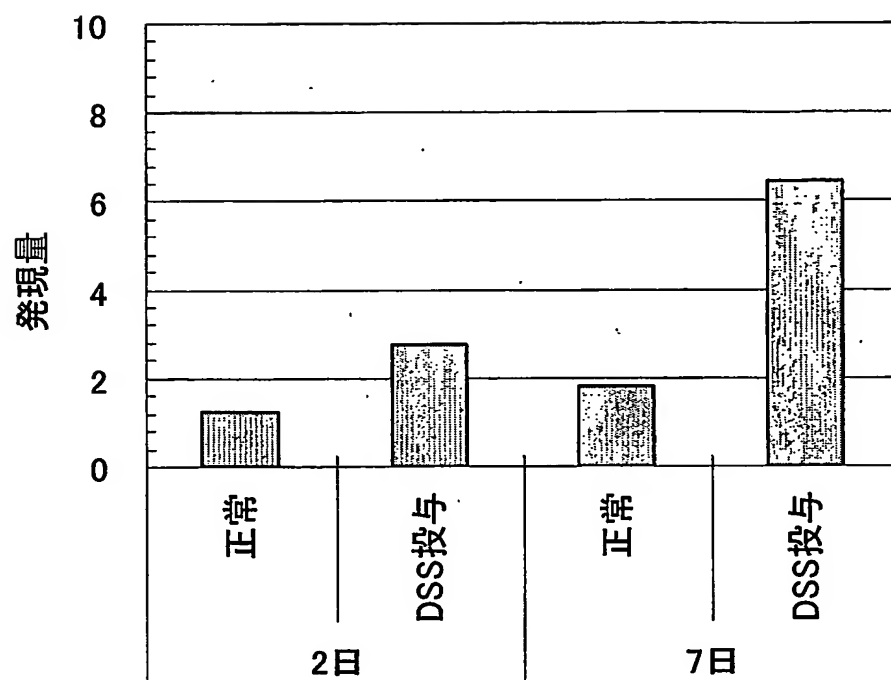
31/33

図 3 1



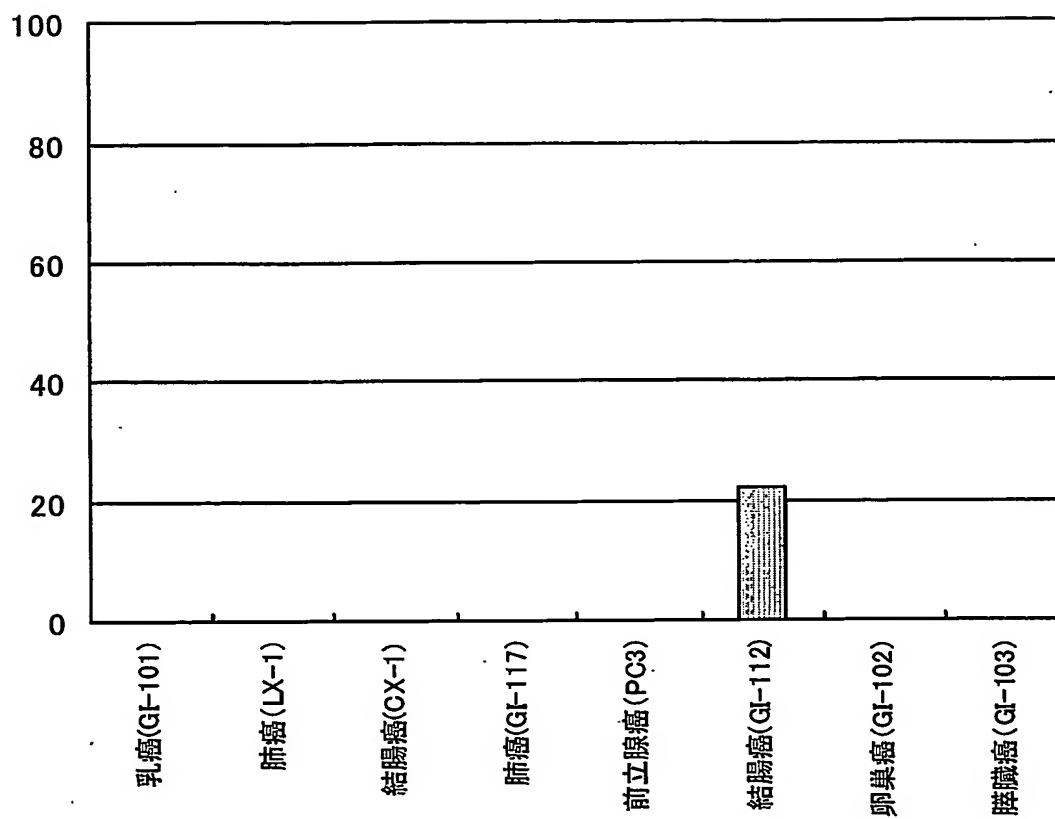
32/33

図 3 2



33/33

3 3

コピー数/ $\mu$ l

## SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemicals Industries, Ltd.

<120> Novel Protein and its DNA

<130> 3015W00P

<150> JP 2002-10840

<151> 2002-1-18

<150> JP 2002-15995

<151> 2002-1-24

<150> JP 2002-25662

<151> 2002-2-1

<150> JP 2002-25706

<151> 2002-2-1

<150> JP 2002-30015

<151> 2002-2-6

<150> JP 2002-33111

<151> 2002-2-8

<150> JP 2002-45058

<151> 2002-2-21

<150> JP 2002-46951

<151> 2002-2-22

<160> 172

<210> 1

<211> 377

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Arg Ala Asn Cys Ser Ser Ser Ser Ala Cys Pro Ala Asn Ser Ser  
5 10 15  
Glu Glu Glu Leu Pro Val Gly Leu Glu Val His Gly Asn Leu Glu Leu  
20 25 30  
Val Phe Thr Val Val Ser Thr Val Met Met Gly Leu Leu Met Phe Ser  
35 40 45  
Leu Gly Cys Ser Val Glu Ile Arg Lys Leu Trp Ser His Ile Arg Arg  
50 55 60  
Pro Trp Gly Ile Ala Val Gly Leu Leu Cys Gln Phe Gly Leu Met Pro  
65 70 75 80  
Phe Thr Ala Tyr Leu Leu Ala Ile Ser Phe Ser Leu Lys Pro Val Gln  
85 90 95  
Ala Ile Ala Val Leu Ile Met Gly Cys Cys Pro Gly Gly Thr Ile Ser  
100 105 110  
Asn Ile Phe Thr Phe Trp Val Asp Gly Asp Met Asp Leu Ser Ile Ser  
115 120 125  
Met Thr Thr Cys Ser Thr Val Ala Ala Leu Gly Met Met Pro Leu Cys  
130 135 140  
Ile Tyr Leu Tyr Thr Trp Ser Trp Ser Leu Gln Gln Asn Leu Thr Ile  
145 150 155 160  
Pro Tyr Gln Asn Ile Gly Ile Thr Leu Val Cys Leu Thr Ile Pro Val  
165 170 175  
Ala Phe Gly Val Tyr Val Asn Tyr Arg Trp Pro Lys Gln Ser Lys Ile  
180 185 190  
Ile Leu Lys Ile Gly Ala Val Val Gly Gly Val Leu Leu Leu Val Val  
195 200 205  
Ala Val Ala Gly Val Val Leu Ala Lys Gly Ser Trp Asn Ser Asp Ile  
210 215 220  
Thr Leu Leu Thr Ile Ser Phe Ile Phe Pro Leu Ile Gly His Val Thr

225	230	235	240
Gly Phe Leu Leu Ala Leu Phe Thr His Gln Ser Trp Gln Arg Cys Arg			
245	250	255	
Thr Ile Ser Leu Glu Thr Gly Ala Gln Asn Ile Gln Met Cys Ile Thr			
260	265	270	
Met Leu Gln Leu Ser Phe Thr Ala Glu His Leu Val Gln Met Leu Ser			
275	280	285	
Phe Pro Leu Ala Tyr Gly Leu Phe Gln Leu Ile Asp Gly Phe Leu Ile			
290	295	300	
Val Ala Ala Tyr Gln Thr Tyr Lys Arg Arg Leu Lys Asn Lys His Gly			
305	310	315	320
Lys Lys Asn Ser Gly Cys Thr Glu Val Cys His Thr Arg Lys Ser Thr			
325	330	335	
Ser Ser Arg Glu Thr Asn Ala Phe Leu Glu Val Asn Glu Glu Gly Ala			
340	345	350	
Ile Thr Pro Gly Pro Pro Gly Pro Met Asp Cys His Arg Ala Leu Glu			
355	360	365	
Pro Val Gly His Ile Thr Ser Cys Glu			
370	375		

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1131

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 2

atgagagcca attgttccag cagctcagcc tgccctgccacacagttcaga ggaggagctg	60
ccagtgggac tggaggtgca tggaaacctg gagctcgttt tcacagtgggt gtccactgtg	120
atgatggggc tgctcatgtt ctctttggga tgttccgtgg agatccggaa gctgtggctg	180
cacatcagga gacctgggg cattgtgtgt ggactgcct gccagtttgg gctcatgcct	240



tttacagcctt atctcctggc cattagcttt tctctgaagc cagtcgaagc tattgctgtt 300  
ctcatcatgg gctgctgccc ggggggcacc atctctaaca tttcacctt ctgggttgat 360  
ggagatatgg atctcagcat cagtaigaca accgttcca ccgtggccgc cctgggaatg 420  
atgccactct gcatttatct ctacacctgg tcttgagtc ttacagcagaa tctcaccatt 480  
ccttatcaga acataggaat tacccttgig tgccigacca ttccgtggc ctttggtgtc 540  
tatgtgaatt acagatggcc aaaacaatcc aaaatcattc tcaagattgg ggccgttgtt 600  
ggtggggtcc tcttcttggt ggtcgcagtt gctgggtgtg tcttgcgaa aggatcttgg 660  
aatcagaca tcacccttct gaccatcagt ttcattttc ctttgattgg ccatgtcacg 720  
ggttttctgc tggcactttt taccaccag tcttggcaaa ggigcaggac aatttcctta 780  
gaaactggag ctcaaatat tcagatgtgc atcaccatgc tccagttaac tttcactgct 840  
gagcacttgg tccagatgtt gagtttcca ctggcctatg gactcttcca gctgatagat 900  
ggatttctta ttgttcagc atatcagacg tacaagagga gattgaagaa caaacatgga 960  
aaaaagaact caggttgac agaagtctgc catacgagga aatcgacttc ttccagagag 1020  
accaatgcct tcttggaggt gaatgaagaa ggtgccatca ctccctgggcc accagggcca 1080  
atggattgcc acagggctct cgagccagtt ggccacatca ctcatgtga a 1131

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 3

aatgctgcct taaggagatg agga

24

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 4

cactggccct accaacaaga ttca

24

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 5

atgagagcca attgttcag cagc

24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 6

ccagccagct agtccttgct attc

24

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

&lt;400&gt; 7

atttaggiga cactatag

18

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 8

aatacgactc actataggg

19

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 9

ttcgccagga ccacaccagc aact

24

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 10

agttgctggt gtggtcctgg cgaa

24

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 1152

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 11

```
atgagagcca attgttccag cagctcagcc tgccctgcc aacagttcaga ggaggagctg    60
ccagtgggac tggaggigca tggaaacctg gagctcgttt tcacagtggg gtccactgtg    120
atgatggggc tgctcatggt ctctttggga tgttccgtgg agatccggaa gctgtgggtc    180
cacatcagga gacctggggg cattgtctgt ggactgtctt gccagtttgg gctcatgcct    240
tttacagctt atctcctggc cattagcttt tctctgaagc cagttcaagc tattgtctgt    300
ctcatcatgg gctgtctgcc gggggggcacc atctctaaac ttttcacctt ctgggttgat    360
ggagatatgg atctcagcat cagtatgaca acctgttcca ccgtggccgc cctgggaatg    420
atgccactct gcatttatct ctacacctgg tcttggagtc ttcagcagaa tctcaccatt    480
ccttatcaga acataggaat tacccttgtg tgccigacca ttccgtgtgg ctttgggtgtc    540
tatgtgaatt acagatggcc aaaacaatcc aaaatcattc tcaagattgg ggccgttgtt    600
ggtgggggtc tcttcttggt ggtcgcagtt gctgggtgtg tcttggcgaa aggatcttgg    660
aattcagaca tcaccttctt gaccatcagt ttcatctttc ctttgattgg ccatgtcacg    720
ggttttctgc tggcactttt taccaccagc tcttggcaaa ggtgcaggac aatttcctta    780
gaaactggag ctcagaatat tcagatgtgc atccaatgc tccagttatc tttcactgct    840
gagcacttgg tccagatgtt gagtttccca ctggcctatg gactcttcca gctgatagat    900
ggatttctta ttgttcagc atatcagacg tacaagagga gattgaagaa caaacatgga    960
aaaaagaact caggttgac agaatgtgc catacgagga aatcgacttc ttccagagag   1020
accaatgcct tcttggaggt gaatgaagaa ggtgccatca ctctggggc accagggcca   1080
atggattgcc acagggctct cgagccagtt ggccacatca ctcatgtga atagcaggga   1140
ctagctggct gg                                     1152
```

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 1152

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 12

```
atgagagcca attgttccag cagctcagcc tgccttgcca acagttcaga ggaggagctg    60
ccagtggggac tggagggtgca tggaaacctg gagctcgttt tcacagtggg gtccactgtg    120
atgatggggc tgcctcatgtt ctctttggga tgttccgtgg agatccggaa gctgtgggtc    180
cacatcagga gaccttgggg cattgtctgt ggactgcctt gccagtttgg gctcatgcct    240
tttacagctt atctcctggc cattagcttt tctctgaagc cagtccaagc tattgtctgt    300
ctcatcatgg gctgtctgcc ggggggcacc atctctaacg ttttcacctt ctgggttgat    360
ggagatatgg atctcagcat cagtaigaca acctgttcca ccgtggccgc cctgggaatg    420
atgccactct gcatttatct ctacacctgg tcttggagtc ttacgcagaa tctcaccatt    480
ccttatcaga acataggaat tacccttgtg tgcctgacca ttctgtggc ctttgggtgc    540
tatgtgaatt acagatggcc aaaacaatcc aaaatcattc tcaagattgg ggccgttgtt    600
ggtgggggtc tcttcttggg ggtcgcagtt gctgggtgtg tcttggcgaa aggatcttgg    660
aattcagaca tcaccttctt gaccatcagt ttcacttttc ctttgattgg ccatgtcacg    720
ggttttctgc tggcactttt taccaccag tcttggcaaa ggtgcaggac aatttcctta    780
gaaactggag ctcagaatat tcagatgtgc atccaatgc tccagttatc tttcactgct    840
gagcacttgg tccagatgtt gagtttccca ctggcctaig gactcttcca gctgatagat    900
ggatttccta ttgttgcagc atatcagacg tacaagagga gatigaagaa caaacatgga    960
aaaaagaact caggttgcac agaagtctgc catacgagga aatcgacttc ttccagagag   1020
accaatgcct tcttggagggt gaatgaagaa ggtgccatca ctctggggcc accagggcca   1080
atggattgcc acagggctct cgagccagtt ggccacatca ctcatgiga atagcaggga   1140
ctagctggct gg                                     1152
```

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 1131

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 13

```

atgagagcca attgittcag cagctcagcc igccctgccac acagttcaga ggaggagctg    60
ccagtgggac tggagggtgca tggaaacctg gagctcgttt tcacagtggt gtccactgtg    120
atgatggggc tgcitcatgtt ctccttggga tgttccgtgg agatccggaa gctgtggtcg    180
cacatcagga gaccttgggg cattgtctgt ggactgtctt gccagtttgg gctcatgcct    240
tttacagctt atctcctggc cattagcttt tctctgaagc cagtccaagc tattgtctgt    300
ctcatcatgg gctgtctgcc ggggggcacc atctctaacg ttttcacctt ctgggttgat    360
ggagatatgg atctcagcat cagtaigaca accgtttcca ccgtggccgc cttgggaatg    420
atgccactct gcatttatct ctacacctgg tcttggagtc ttcagcagaa ttcaccatt    480
ccttatcaga acataggaat tacccttgtg tgcctgacca ttcctgtggc ctttgggtgc    540
tatgtgaatt acagatggcc aaaacaatcc aaaatcattc tcaagattgg ggccgttgtt    600
ggtgggggtc tcttcttggg ggtcgcagtt gctgggtgtg tcttggcgaa aggatcttgg    660
aatcagaca tcaccttct gaccatcagt ttcatcttcc ctttgattgg ccatgtcacg    720
ggttttctgc tggcactttt taccaccag tcttggcaaa ggtgcaggac aatttcctta    780
gaaactggag ctcagaatat tcagatgtgc atcaccatgc tccagttatc tticactgct    840
gagcacttgg tccagatgtt gagtttccca ctggcctatg gactcttcca gctgatagat    900
ggatttctta tigtgtcagc atatcagacg tacaagagga gattgaagaa caaacatgga    960
aaaaagaact caggttgcac agaagtctgc catacgagga aatcgacttc ttccagagag   1020
accaatgcct tcttggaggt gaatgaagaa ggtgccatca ctcttgggcc accagggcca   1080
atggattgcc acagggctct cgagccagtt ggccacatca ctcatgtga a             1131

```

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 377

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 14

Met Arg Ala Asn Cys Ser Ser Ser Ser Ala Cys Pro Ala Asn Ser Ser

5

10

15

Glu Glu Glu Leu Pro Val Gly Leu Glu Val His Gly Asn Leu Glu Leu

20

25

30

Val Phe Thr Val Val Ser Thr Val Met Met Gly Leu Leu Met Phe Ser  
35 40 45  
Leu Gly Cys Ser Val Glu Ile Arg Lys Leu Trp Ser His Ile Arg Arg  
50 55 60  
Pro Trp Gly Ile Ala Val Gly Leu Leu Cys Gln Phe Gly Leu Met Pro  
65 70 75 80  
Phe Thr Ala Tyr Leu Leu Ala Ile Ser Phe Ser Leu Lys Pro Val Gln  
85 90 95  
Ala Ile Ala Val Leu Ile Met Gly Cys Cys Pro Gly Gly Thr Ile Ser  
100 105 110  
Asn Val Phe Thr Phe Trp Val Asp Gly Asp Met Asp Leu Ser Ile Ser  
115 120 125  
Met Thr Thr Cys Ser Thr Val Ala Ala Leu Gly Met Met Pro Leu Cys  
130 135 140  
Ile Tyr Leu Tyr Thr Trp Ser Trp Ser Leu Gln Gln Asn Leu Thr Ile  
145 150 155 160  
Pro Tyr Gln Asn Ile Gly Ile Thr Leu Val Cys Leu Thr Ile Pro Val  
165 170 175  
Ala Phe Gly Val Tyr Val Asn Tyr Arg Trp Pro Lys Gln Ser Lys Ile  
180 185 190  
Ile Leu Lys Ile Gly Ala Val Val Gly Gly Val Leu Leu Leu Val Val  
195 200 205  
Ala Val Ala Gly Val Val Leu Ala Lys Gly Ser Trp Asn Ser Asp Ile  
210 215 220  
Thr Leu Leu Thr Ile Ser Phe Ile Phe Pro Leu Ile Gly His Val Thr  
225 230 235 240  
Gly Phe Leu Leu Ala Leu Phe Thr His Gln Ser Trp Gln Arg Cys Arg  
245 250 255  
Thr Ile Ser Leu Glu Thr Gly Ala Gln Asn Ile Gln Met Cys Ile Thr

260 265 270  
Met Leu Gln Leu Ser Phe Thr Ala Glu His Leu Val Gln Met Leu Ser  
275 280 285  
Phe Pro Leu Ala Tyr Gly Leu Phe Gln Leu Ile Asp Gly Phe Leu Ile  
290 295 300  
Val Ala Ala Tyr Gln Thr Tyr Lys Arg Arg Leu Lys Asn Lys His Gly  
305 310 315 320  
Lys Lys Asn Ser Gly Cys Thr Glu Val Cys His Thr Arg Lys Ser Thr  
325 330 335  
Ser Ser Arg Glu Thr Asn Ala Phe Leu Glu Val Asn Glu Glu Gly Ala  
340 345 350  
Ile Thr Pro Gly Pro Pro Gly Pro Met Asp Cys His Arg Ala Leu Glu  
355 360 365  
Pro Val Gly His Ile Thr Ser Cys Glu  
370 375

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 15

tctgccatac gaggaatcg a

21

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 16

caggagtgat ggcaccttct tc

22

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Probe

&lt;400&gt; 17

tcttccagag agaccaatgc ctctttgg

28

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 798

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 18

Met Ala Leu Gln Met Phe Val Thr Tyr Ser Pro Trp Asn Cys Leu Leu

5

10

15

Leu Leu Val Ala Leu Glu Cys Ser Glu Ala Ser Ser Asp Leu Asn Glu

20

25

30

Ser Ala Asn Ser Thr Ala Gln Tyr Ala Ser Asn Ala Trp Phe Ala Ala

35

40

45

Ala Ser Ser Glu Pro Glu Glu Gly Ile Ser Val Phe Glu Leu Asp Tyr

50

55

60

Asp Tyr Val Gln Ile Pro Tyr Glu Val Thr Leu Trp Ile Leu Leu Ala

65

70

75

80

Ser Leu Ala Lys Ile Gly Phe His Leu Tyr His Arg Leu Pro Gly Leu  
85 90 95  
Met Pro Glu Ser Cys Leu Leu Ile Leu Val Gly Ala Leu Val Gly Gly  
100 105 110  
Ile Ile Phe Gly Thr Asp His Lys Ser Pro Pro Val Met Asp Ser Ser  
115 120 125  
Ile Tyr Phe Leu Tyr Leu Leu Pro Pro Ile Val Leu Glu Gly Gly Tyr  
130 135 140  
Phe Met Pro Thr Arg Pro Phe Phe Glu Asn Ile Gly Ser Ile Leu Trp  
145 150 155 160  
Trp Ala Val Leu Gly Ala Leu Ile Asn Ala Leu Gly Ile Gly Leu Ser  
165 170 175  
Leu Tyr Leu Ile Cys Gln Val Lys Ala Phe Gly Leu Gly Asp Val Asn  
180 185 190  
Leu Leu Gln Asn Leu Leu Phe Gly Ser Leu Ile Ser Ala Val Asp Pro  
195 200 205  
Val Ala Val Leu Ala Val Phe Glu Glu Ala Arg Val Asn Glu Gln Leu  
210 215 220  
Tyr Met Met Ile Phe Gly Glu Ala Leu Leu Asn Asp Gly Ile Thr Val  
225 230 235 240  
Val Leu Tyr Asn Met Leu Ile Ala Phe Thr Lys Met His Lys Phe Glu  
245 250 255  
Asp Ile Glu Thr Val Asp Ile Leu Ala Gly Cys Ala Arg Phe Ile Val  
260 265 270  
Val Gly Leu Gly Gly Val Leu Phe Gly Ile Val Phe Gly Phe Ile Ser  
275 280 285  
Ala Phe Ile Thr Arg Phe Thr Gln Asn Ile Ser Ala Ile Glu Pro Leu  
290 295 300  
Ile Val Phe Met Phe Ser Tyr Leu Ser Tyr Leu Ala Ala Glu Thr Leu

305                      310                      315                      320  
Tyr Leu Ser Gly Ile Leu Ala Ile Thr Ala Cys Ala Val Thr Met Lys  
                         325                      330                      335  
Lys Tyr Val Glu Glu Asn Val Ser Gln Thr Ser Tyr Thr Thr Ile Lys  
                         340                      345                      350  
Tyr Phe Met Lys Met Leu Ser Ser Val Ser Glu Thr Leu Ile Phe Ile  
                         355                      360                      365  
Phe Met Gly Val Ser Thr Val Gly Lys Asn His Glu Trp Asn Trp Ala  
                         370                      375                      380  
Phe Ile Cys Phe Thr Leu Ala Phe Cys Gln Ile Trp Arg Ala Ile Ser  
385                      390                      395                      400  
Val Phe Ala Leu Phe Tyr Ile Ser Asn Gln Phe Arg Thr Phe Pro Phe  
                         405                      410                      415  
Ser Ile Lys Asp Gln Cys Ile Ile Phe Tyr Ser Gly Val Arg Gly Ala  
                         420                      425                      430  
Gly Ser Phe Ser Leu Ala Phe Leu Leu Pro Leu Ser Leu Phe Pro Arg  
                         435                      440                      445  
Lys Lys Met Phe Val Thr Ala Thr Leu Val Val Ile Tyr Phe Thr Val  
                         450                      455                      460  
Phe Ile Gln Gly Ile Thr Val Gly Pro Leu Val Arg Tyr Leu Asp Val  
465                      470                      475                      480  
Lys Lys Thr Asn Lys Lys Glu Ser Ile Asn Glu Glu Leu His Ile Arg  
                         485                      490                      495  
Leu Met Asp His Leu Lys Ala Gly Ile Glu Asp Val Cys Gly His Trp  
                         500                      505                      510  
Ser His Tyr Gln Val Arg Asp Lys Phe Lys Lys Phe Asp His Arg Tyr  
                         515                      520                      525  
Leu Arg Lys Ile Leu Ile Arg Lys Asn Leu Pro Lys Ser Ser Ile Val  
                         530                      535                      540

Ser Leu Tyr Lys Lys Leu Glu Met Lys Gln Ala Ile Glu Met Val Glu  
545 550 555 560  
Thr Gly Ile Leu Ser Ser Thr Ala Phe Ser Ile Pro His Gln Ala Gln  
565 570 575  
Arg Ile Gln Gly Ile Lys Arg Leu Ser Pro Glu Asp Val Glu Ser Ile  
580 585 590  
Arg Asp Ile Leu Thr Ser Asn Met Tyr Gln Val Arg Gln Arg Thr Leu  
595 600 605  
Ser Tyr Asn Lys Tyr Asn Leu Lys Pro Gln Thr Ser Glu Lys Gln Ala  
610 615 620  
Lys Glu Ile Leu Ile Arg Arg Gln Asn Thr Leu Arg Glu Ser Met Arg  
625 630 635 640  
Lys Gly His Ser Leu Pro Trp Gly Lys Pro Ala Gly Thr Lys Asn Ile  
645 650 655  
Arg Tyr Leu Ser Tyr Pro Tyr Gly Asn Pro Gln Ser Ala Gly Arg Asp  
660 665 670  
Thr Arg Ala Ala Gly Phe Ser Asp Asp Asp Ser Ser Asp Pro Gly Ser  
675 680 685  
Pro Ser Ile Thr Phe Ser Ala Cys Ser Arg Ile Gly Ser Leu Gln Lys  
690 695 700  
Gln Glu Ala Gln Glu Ile Ile Pro Met Lys Ser Leu His Arg Gly Arg  
705 710 715 720  
Lys Ala Phe Ser Phe Gly Tyr Gln Arg Asn Thr Ser Gln Glu Glu Tyr  
725 730 735  
Leu Gly Gly Val Arg Arg Val Ala Leu Arg Pro Lys Pro Leu Phe His  
740 745 750  
Ala Val Asp Glu Glu Gly Glu Ser Gly Gly Glu Ser Glu Gly Lys Ala  
755 760 765  
Ser Leu Val Glu Val Arg Ser Arg Trp Thr Ala Asp His Gly His Ser

770

775

780

Arg Asp His His Arg Ser His Ser Pro Leu Leu Gln Lys Lys

785

790

795

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 2394

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 19

atggctctgc agatgttcgt gacttacagt ccttggaatt gtttgctact gctagtggct	60
cttgagtgtt ctgaagcatc ttctgatttg aatgaatctg caaatccac tgctcagtat	120
gcatctaacg cttaggtttgc tgctgccagc tcagagccag aggaagggat atctgttttt	180
gaactggatt atgactatgt gcaaaticct tatgaggcca ctctctggat acttctagca	240
tcccttgcaa aaataggcct ccacctctac cacaggctgc caggccctcat gccagaaagc	300
tgcctcctca tcctgggtggg ggcgctggig ggcgggcatc tcttcggcac cgaccacaaa	360
tcacctccgg tcatggactc cagcatctac ttcttgtatc tcttgccacc catcgttctg	420
gagggcggct acttcatgcc caccgggccc ttctttgaga acatcggctc catccigtgg	480
tgggcagtat tgggggccct gatcaacgcc ttgggcattg gcctctccct ctacctcatc	540
tgccaggtga aggccttttg cctgggcgac gtcaacctgc tgcagaacct gctgttcggc	600
agcctgatct ccgccgtgga ccagtgggc gtgctagccg tgtttgagga agcgcgctg	660
aacgagcagc tctacatgat gatctttggg gaggccttgc tcaatgatgg cattactgtg	720
gtcttataca atatgttaat tgcctttaca aagatgcata aatttgaaga catagaaact	780
gtcgacattt tggctggatg tgcccgattc atcgttgttg ggcttggagg ggtattgttt	840
ggcatcgttt ttggatttat ttctgcattt atcacacgtt tcaatcagaa tatctctgca	900
attgagccac tcatcgtctt catgttcagc tatttgtctt acttagctgc tgaaacctc	960
tatctctccg gcaccttggc aatcacagcc tgcgcagtaa caatgaaaaa gtacgtggaa	1020
gaaaacgtgt cccagacatc atacacgacc atcaagtact tcatgaagat gctgagcagc	1080
gtcagcgaga ccttgatctt catcttcatg ggtgtgtcca ctgtgggcaa gaatcacgag	1140
tggaactggg ccttcatctg ctccacctg gccttctgcc aaatctggag agccatcagc	1200

gtatttgctc tcttctatai cagtaaccag ttctggactt tccccttctc catcaaggac 1260  
 cagtgcata ttttctacag tggigtctga ggagctggaa gtttttact tgcatttttg 1320  
 ctctctctgt ctccttttcc taggaagaaa atgtttgtca ctgctactct agtagttata 1380  
 tactttactg tatttattca gggaatcaca gttagccctc tggtcaggta cctggatgtt 1440  
 aaaaaaacca ataaaaaaga atccatcaat gaagagcttc atattcgtct gatggatcac 1500  
 ttaaaggctg gaatcgaaga tgtgtgtggg cactggagtc actaccaagi gagagacaag 1560  
 ttttaagaagt ttgatcatag atacttacgg aaaatcctca tcagaaagaa cctacccaaa 1620  
 tcaagcattg ttcttttcta caagaagctg gaaatgaagc aagccatcga gatgggtggag 1680  
 actgggatac tgagctctac agctttctcc ataccccatc aggcccagag gatacaagga 1740  
 atcaaaagac ttccccctga agatgtggag tccataaggg acattctgac atccaacatg 1800  
 taccaagttc ggcaaaggac cctgtcctac aacaaataca acctcaaacc ccaacaagt 1860  
 gagaagcagg cttaaagagat tctgatccgc cgccagaaca ccttaaggga gagcatgagg 1920  
 aaaggtcaca gcctgccctg gggaaagccg gctggcacca agaataatccg ctacctctcc 1980  
 taccctctac ggaatcctca gtctgcagga agagacacaa gggctgctgg gtctctagat 2040  
 gatgacagca gtgatccagg atccccatcc atcacgttca gcgcatgctc tcggataggg 2100  
 tcacttcaga agcaagaggc acaagaaata ataccaatga agagcctaca cagaggaagg 2160  
 aaggcattca gctttggtta tcaaagaaac acaagccaag aagagtactt ggggtggagta 2220  
 aggagggtgg ccttaagacc caaacctctg ttcatgcag tggatgagga ggggtgagctt 2280  
 ggagggggaga gtgagggcaa ggccctcttg gttaggttc ggtcgaggtg gacagctgac 2340  
 catggacaca gcagggacca tcacaggctc catagtcctt tgctccaaaa aaaa 2394

<210> 20

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 20

ccatcctaatac gacttact atagggc

<210> 21

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 21

gcatgaagta gccgccctcc agaacga

27

<210> 22

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 22

actcactata gggctcgagc ggc

23

<210> 23

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 23

cagaacgatg ggtggcagga gatacagga

29

<210> 24

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 24

cgccgccaga acaccttaag ggagagcat

29

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 25

ggctggcacc aagaatatcc gctacct

27

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 26

tccacacagg ggtgtaggta g

21

<210> 27

<211> 21

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 27

tgtggacaat aacactatit t

21

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 28

aggtaggaga agcccacagg aatg

24

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 29

caataacact attttttttg gagc

24

<210> 30

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 30

caggaaacag ctatgac

17

<210> 31

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 31

gtaaaacgac ggccag

16

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 32

cccttctttg agaacatcgg c

21

<210> 33

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 33

aatgcccaag gcgttgatc

19

<210> 34

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 34

acagcctgcg cagtaacaat gaaaaagt

28

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 35

ttgtacaaga agctggaaat gaa

23

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 36

acttgatggc cgtgtaigat gtcig

25

<210> 37

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 37

ctgggcctga tggggtatgg agaaag

26

<210> 38

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 38

ccatccctgtg gigggcagta ttggg

25

<210> 39

<211> 511

<212> DNA

<213> Human

<400> 39

agggtggatgc agtcactctc tagaagccic cccgacttca gatgtgtggc acacatccac 60  
acaggggtgt aggtaggaga agcccacagg aatggctctg cagatgttcg tgacttacag 120  
tccttggaaat tgtttgctac tgctagtggc tcttgagtgt tctgaagcat cttctgattt 180  
gaatgaatct gcaaattcca ctgctcagta tgcatctaac gcttggtttg ctgctgccag 240  
ctcagagcca gaggaaggga taictgtttt tgaactggat tatgactatg tgcaaattcc 300  
ttatgaggtc actctctgga tacttctagc atcccttgca aaaataggct tccacctcta 360

ccacaggctg ccaggcctca tgccagaaag ctgcctcctc atcctgggtg gggcgctgg 420  
gggcggcatc atcttcggca ccgaccacaa atcacctccg gtcattggact ccagcatcta 480  
cttctgtat ctctgccac ccatcgttct g 511

<210> 40

<211> 462

<212> DNA

<213> Human

<400> 40

ggctggcacc aagaatatcc gctacctctc ctacccctac gggaatcctc agtctgcagg 60  
aagagacaca agggctgctg ggttctcaga tgatgacagc agtgatccag gatcccatc 120  
catcacgttc agcgcatgct ctcgatagg gtcacitcag aagcaagagg cacaagaaat 180  
aataccaatg aagagcctac acagaggaag gaaggcattc agctttggtt atcaaagaaa 240  
cacaagccaa gaagagtact tgggtggagt aaggagggig gccttaagac ccaaacctct 300  
gtttcatgca gtggatgagg agggtagagc tggaggggag agtgagggca aggcctcttt 360  
ggttagggtt cggtcgaggt ggacagctga ccatggacac agcagggacc atcacaggtc 420  
ccatagtcct ttgctccaaa aaaaatagtg ttattgtcca ca 462

<210> 41

<211> 2426

<212> DNA

<213> Human

<400> 41

aggtaggaga agcccacagg aatggctctg cagatgttcg tgacttacag tccttggaat 60  
tgtttgctac tgctagtggc tcttgagtgt tctgaagcat ctctgatit gaatgaatct 120  
gcaaattcca ctgctcagta tgcatctaac gcttgggttg ctgctgccag ctgagagcca 180  
gaggaaggga tatctgtttt tgaactggat tatgaciatg tgcaaattcc ttatgaggtc 240  
actctctgga tacttctagc atcccttgca aaaataggct tccacctcta ccacaggctg 300  
ccaggcctca tgccagaaag ctgcctcctc atcctgggtg gggcgctggg gggcggcatc 360

atcttcggca cgcaccacaa atcacctccg gtcattggact ccagcatcta cticctgtat 420  
ctcctgccac ccatcgttct ggagggcggc tacttcatgc ccaccggcc cttctttgag 480  
aacatcggct ccatcctgtg gtgggcagta ttggggggccc tgatcaacgc cttgggcatt 540  
ggcctctccc tctacctcat ctgccaggig aaggcctttg gccitgggca cgtcaacctg 600  
ctgcagaacc tgcgttcgg cagcctgatc tccgccgtgg acccagtggc cgtgctagcc 660  
gtgtttgagg aagcgcgcgt gaacgagcag ctctacatga tgatctttgg ggaggccctg 720  
ctcaatgatg gcattactgt ggctttatc aatatgttaa ttgcctttac aaagatgcat 780  
aaatttgaag acatagaaac tgcgcacatt ttggctggat gtgcccgaatt catcgttgtg 840  
gggcttggag gggatattgt ttggcatcgt ttgggattta tttctgcatt tatcacacgt 900  
ttcactcaga atatctctgc aattgagcca ctcatcgtct tcatgttcag ctatttgtct 960  
tacttagctg ctgaaaccct ctatctctcc ggcatcctgg caatcacagc ctgcgcagta 1020  
acaatgaaaa agtacgtgga agaaaacgtg tcccagacat catacacgac catcaagtac 1080  
ttcatgaaga tgcagagcag cgtcagcgag accttgatct tcatcttcat ggggtgtgtc 1140  
actgtgggca agaatacga gtggaactgg gcccttcatct gcttcacctt ggccttctgc 1200  
caaatactgga gagccatcag cgtatttgtt ctcttctata tcagtaacca gtttcggact 1260  
ttccccctct ccatcaagga ccagtgcac attttctaca gtgggtgttcg aggagctgga 1320  
agtttttca cttgattttt gcttctctctg tctctttttc ctaggaagaa aatgtttgtc 1380  
actgctactc tagtagttat atactttact gtattttattc agggaaatcac agttggccct 1440  
ctggctcaggt acctggatgt taaaaaaacc aataaaaaag aatccatcaa tgaagagctt 1500  
catattctgc tgatggatca cttaaaggct ggaatcgaag atgtgtgtgg gcactggagt 1560  
cactaccaag tgagagacaa gttaaagaag ttgatcata gatacttacg gaaaatcctc 1620  
atcagaaaga acctaccaa atcaagcatt gtttctttgt acaagaagct ggaaatgaag 1680  
caagccatcg agatgggtgga gactgggata ctgagctcta cagctttctc cataccccat 1740  
caggcccaga ggatacaagg aatcaaaaaga ctttccccctg aagatgtgga gtccataagg 1800  
gacattctga catccaacat gtaccaagtt cggcaaagga cctgttctta caacaatac 1860  
aacctcaaac cccaacaag tgagaagcag gctaaagaga ttctgatccg ccgccagaac 1920  
accttaaggg agagcatgag gaaaggctac agcctgccct ggggaaagcc ggctggcacc 1980  
aagaatatcc gctacctctc ctacccctac gggaatcctc agtctgcagg aagagacaca 2040  
agggtgtctg ggttctcaga tgatgacagc agtgatccag gatcccatc catcacgttc 2100

agcgcatgct ctcggaatagg gtcacttcag aagcaagagg cacaagaaat aataccaatg 2160  
 aagagcctac acagaggaag gaaggcattc agctttgggtt atcaaagaaa cacaagccaa 2220  
 gaagagtact tgggtggagt aaggaggggtg gccttaagac ccaaacctct gtttcatgca 2280  
 gtggatgagg agggigagtc tggaggggag agtgagggca aggcctcttt ggttgagggt 2340  
 cggtcgaggt ggacagctga ccatggacac agcagggacc atcacaggtc ccatagtcct 2400  
 ttgtcctaaa aaaaatagtg ttattg 2426

<210> 42

<211> 1148

<212> PRT

<213> Human

<400> 42

Met Ser Arg Ala Thr Ser Val Gly Asp Gln Leu Glu Ala Pro Ala Arg

5

10

15

Thr Ile Tyr Leu Asn Gln Pro His Leu Asn Lys Phe Arg Asp Asn Gln

20

25

30

Ile Ser Thr Ala Lys Tyr Ser Val Leu Thr Phe Leu Pro Arg Phe Leu

35

40

45

Tyr Glu Gln Ile Arg Arg Ala Ala Asn Ala Phe Phe Leu Phe Ile Ala

50

55

60

Leu Leu Gln Gln Ile Pro Asp Val Ser Pro Thr Gly Arg Tyr Thr Thr

65

70

75

80

Leu Val Pro Leu Ile Ile Ile Leu Thr Ile Ala Gly Ile Lys Glu Ile

85

90

95

Val Glu Asp Phe Lys Arg His Lys Ala Asp Asn Ala Val Asn Lys Lys

100

105

110

Lys Thr Ile Val Leu Arg Asn Gly Met Trp His Thr Ile Met Trp Lys

115

120

125

Glu Val Ala Val Gly Asp Ile Val Lys Val Val Asn Gly Gln Tyr Leu

130 135 140  
Pro Ala Asp Val Val Leu Leu Ser Ser Ser Glu Pro Gln Ala Met Cys  
145 150 155 160  
Tyr Val Glu Thr Ala Asn Leu Asp Gly Glu Thr Asn Leu Lys Ile Arg  
165 170 175  
Gln Gly Leu Ser His Thr Ala Asp Met Gln Thr Arg Glu Val Leu Met  
180 185 190  
Lys Leu Ser Gly Thr Ile Glu Cys Glu Gly Pro Asn Arg His Leu Tyr  
195 200 205  
Asp Phe Thr Gly Asn Leu Asn Leu Asp Gly Lys Ser Leu Val Ala Leu  
210 215 220  
Gly Pro Asp Gln Ile Leu Leu Arg Gly Thr Gln Leu Arg Asn Thr Gln  
225 230 235 240  
Trp Val Phe Gly Ile Val Val Tyr Thr Gly His Asp Thr Lys Leu Met  
245 250 255  
Gln Asn Ser Thr Lys Ala Pro Leu Lys Arg Ser Asn Val Glu Lys Val  
260 265 270  
Thr Asn Val Gln Ile Leu Val Leu Phe Gly Ile Leu Leu Val Met Ala  
275 280 285  
Leu Val Ser Ser Ala Gly Ala Leu Tyr Trp Asn Arg Ser His Gly Glu  
290 295 300  
Lys Asn Trp Tyr Ile Lys Lys Met Asp Thr Thr Ser Asp Asn Phe Gly  
305 310 315 320  
Tyr Asn Leu Leu Thr Phe Ile Ile Leu Tyr Asn Asn Leu Ile Pro Ile  
325 330 335  
Ser Leu Leu Val Thr Leu Glu Val Val Lys Tyr Thr Gln Ala Leu Phe  
340 345 350  
Ile Asn Trp Asp Thr Asp Met Tyr Tyr Ile Gly Asn Asp Thr Pro Ala  
355 360 365



Met Ala Arg Thr Ser Asn Leu Asn Glu Glu Leu Gly Gln Val Lys Tyr  
370 375 380  
Leu Phe Ser Asp Lys Thr Gly Thr Leu Thr Cys Asn Ile Met Asn Phe  
385 390 395 400  
Lys Lys Cys Ser Ile Ala Gly Val Thr Tyr Gly His Phe Pro Glu Leu  
405 410 415  
Ala Arg Glu Pro Ser Ser Asp Asp Phe Cys Arg Met Pro Pro Pro Cys  
420 425 430  
Ser Asp Ser Cys Asp Phe Asp Asp Pro Arg Leu Leu Lys Asn Ile Glu  
435 440 445  
Asp Arg His Pro Thr Ala Pro Cys Ile Gln Glu Phe Leu Thr Leu Leu  
450 455 460  
Ala Val Cys His Thr Val Val Pro Glu Lys Asp Gly Asp Asn Ile Ile  
465 470 475 480  
Tyr Gln Ala Ser Ser Pro Asp Glu Ala Ala Leu Val Lys Gly Ala Lys  
485 490 495  
Lys Leu Gly Phe Val Phe Thr Ala Arg Thr Pro Phe Ser Val Ile Ile  
500 505 510  
Glu Ala Met Gly Gln Glu Gln Thr Phe Gly Ile Leu Asn Val Leu Glu  
515 520 525  
Phe Ser Ser Asp Arg Lys Arg Met Ser Val Ile Val Arg Thr Pro Ser  
530 535 540  
Gly Arg Leu Arg Leu Tyr Cys Lys Gly Ala Asp Asn Val Ile Phe Glu  
545 550 555 560  
Arg Leu Ser Lys Asp Ser Lys Tyr Met Glu Glu Thr Leu Cys His Leu  
565 570 575  
Glu Tyr Phe Ala Thr Glu Gly Leu Arg Thr Leu Cys Val Ala Tyr Ala  
580 585 590  
Asp Leu Ser Glu Asn Glu Tyr Glu Glu Trp Leu Lys Val Tyr Gln Glu

595 600 605  
Ala Ser Thr Ile Leu Lys Asp Arg Ala Gln Arg Leu Glu Glu Cys Tyr  
610 615 620  
Glu Ile Ile Glu Lys Asn Leu Leu Leu Gly Ala Thr Ala Ile Glu  
625 630 635 640  
Asp Arg Leu Gln Ala Gly Val Pro Glu Thr Ile Ala Thr Leu Leu Lys  
645 650 655  
Ala Glu Ile Lys Ile Trp Val Leu Thr Gly Asp Lys Gln Glu Thr Ala  
660 665 670  
Ile Asn Ile Gly Tyr Ser Cys Arg Leu Val Ser Gln Asn Met Ala Leu  
675 680 685  
Ile Leu Leu Lys Glu Asp Ser Leu Asp Ala Thr Arg Ala Ala Ile Thr  
690 695 700  
Gln His Cys Thr Asp Leu Gly Asn Leu Leu Gly Lys Glu Asn Asp Val  
705 710 715 720  
Ala Leu Ile Ile Asp Gly His Thr Leu Lys Tyr Ala Leu Ser Phe Glu  
725 730 735  
Val Arg Arg Ser Phe Leu Asp Leu Ala Leu Ser Cys Lys Ala Val Ile  
740 745 750  
Cys Cys Arg Val Ser Pro Leu Gln Lys Ser Glu Ile Val Asp Val Val  
755 760 765  
Lys Lys Arg Val Lys Ala Ile Thr Leu Ala Ile Gly Asp Gly Ala Asn  
770 775 780  
Asp Val Gly Met Ile Gln Thr Ala His Val Gly Val Gly Ile Ser Gly  
785 790 795 800  
Asn Glu Gly Met Gln Ala Thr Asn Asn Ser Asp Tyr Ala Ile Ala Gln  
805 810 815  
Phe Ser Tyr Leu Glu Lys Leu Leu Leu Val His Gly Ala Trp Ser Tyr  
820 825 830

Asn Arg Val Thr Lys Cys Ile Leu Tyr Cys Phe Tyr Lys Asn Val Val  
835 840 845  
Leu Tyr Ile Ile Glu Leu Trp Phe Ala Phe Val Asn Gly Phe Ser Gly  
850 855 860  
Gln Ile Leu Phe Glu Arg Trp Cys Ile Gly Leu Tyr Asn Val Ile Phe  
865 870 875 880  
Thr Ala Leu Pro Pro Phe Thr Leu Gly Ile Phe Glu Arg Ser Cys Thr  
885 890 895  
Gln Glu Ser Met Leu Arg Phe Pro Gln Leu Tyr Lys Ile Thr Gln Asn  
900 905 910  
Gly Glu Gly Phe Asn Thr Lys Val Phe Trp Gly His Cys Ile Asn Ala  
915 920 925  
Leu Val His Ser Leu Ile Leu Phe Trp Phe Pro Met Lys Ala Leu Glu  
930 935 940  
His Asp Thr Val Leu Thr Ser Gly His Ala Thr Asp Tyr Leu Phe Val  
945 950 955 960  
Gly Asn Ile Val Tyr Thr Tyr Val Val Val Thr Val Cys Leu Lys Ala  
965 970 975  
Gly Leu Glu Thr Thr Ala Trp Thr Lys Phe Ser His Leu Ala Val Trp  
980 985 990  
Gly Ser Met Leu Thr Trp Leu Val Phe Phe Gly Ile Tyr Ser Thr Ile  
995 1000 1005  
Trp Pro Thr Ile Pro Ile Ala Pro Asp Met Arg Gly Gln Ala Thr Met  
1010 1015 1020  
Val Leu Ser Ser Ala His Phe Trp Leu Gly Leu Phe Leu Val Pro Thr  
1025 1030 1035 1040  
Ala Cys Leu Ile Glu Asp Val Ala Trp Arg Ala Ala Lys His Thr Cys  
1045 1050 1055  
Lys Lys Thr Leu Leu Glu Glu Val Gln Glu Leu Glu Thr Lys Ser Arg

1060	1065	1070
Val Leu Gly Lys Ala Val Leu Arg Asp Ser Asn Gly Lys Arg Leu Asn		
1075	1080	1085
Glu Arg Asp Arg Leu Ile Lys Arg Leu Gly Arg Lys Thr Pro Pro Thr		
1090	1095	1100
Leu Phe Arg Gly Ser Ser Leu Gln Gln Gly Val Pro His Gly Tyr Ala		
1105	1110	1115
Phe Ser Gln Glu Glu His Gly Ala Val Ser Gln Glu Glu Val Ile Arg		
1125	1130	1135
Ala Tyr Asp Thr Thr Lys Lys Lys Ser Arg Lys Lys		
1140	1145	

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 3444

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 43

atgtcccggg ccacgtctgt tggagaccag ctggaggcac ccgcccgcac catttacctc	60
aaccaaccgc atctcaacaa attccgcgac aaccagatca gtacggccaa gtacagcgig	120
ttgacatttc tacctcgatt cttgtatgag cagattagaa gagctgctaa tgccttcttt	180
ctcttcattg ccttattaca gcaaaticca gatgtatctc caacaggaag atataccacc	240
ctggtgccat tgatcattat ttttaacaatt gcaggcatca aagagattgt agaagatttt	300
aagcgacaca aggcagacaa tgcagttaac aaaaagaaaa caatagtgtt aagaaatggt	360
atgtggcata ccattatgtg gaaagagggtg gcagtgggag acatttgtga ggtcgtcaat	420
gggcagtatc ttccagcaga tgtggtcctg ctgtcatcca gtgaacctca ggcaatgtgt	480
tatgttgaaa cagctaactt ggatggggag acgaacctta aaatacgtca gggtttgagt	540
cacactgctg acatgcaaac acgtgaagtt ctgatgaagt tatctggaac tatagagtgt	600
gaagggccca accgccacct ctatgacttc actggaaact tgaacttaga tgggaaaagc	660
cttgttgccc ttgggcctga ccagatctta ttaagaggta cacagcttag aaatactcag	720

tgggtctttg gcatagtgtt ttatactgga caccgacacca aactcatgca gaattcaacc 780  
aaagcgccctc tcaagagatc aaatgttgag aaggtagacta acgtgcagat cctgggtgtt 840  
tttggcatcc tcttggatcat ggccttggig agctcggcgg gggccctgta ctggaacagg 900  
tctcatggig aaaagaactg gtacatcaag aagatggaca ccacctcaga taattttgga 960  
tacaacctac tgacgttcat catcttatac aacaatctta ttcctcatcag tctgttggig 1020  
actcttgagg ttgtgaagta tactcaagcc cttttcataa actgggacac agatatgtat 1080  
tatataggaa atgacactcc tgccatggcc aggacatcaa acctaatga agagcttggg 1140  
caggtgaaat atctcttttc tgacaagact ggaacgccta catgcaatat catgaacttt 1200  
aagaagtgcg gcattgccgg agtaacctat ggtcacttcc cagaattggc aagagagccg 1260  
tcttcagatg acttctgtcg gatgcctcct cctgttagtg attcctgtga ctttgatgac 1320  
cccaggctgt tgaagaacat tgaggatcgc catccacag ccccttgcct tcaggagttc 1380  
ctcacccttc tggccgtgtg ccacacgggt gtctctgaga aggatggaga taacatcatc 1440  
taccaggcct ctccccaga tgaagctgct ttggtgaaag gagctaaaaa gctgggcctt 1500  
gtcttcacag ccagaacacc attctcagtc atcatagaag cgatgggaca ggaacaaaca 1560  
ttcggaatcc ttaatgtcct ggaattttct agtgacagaa aaagaatgtc tgtaattgtt 1620  
cgaactcctt caggacgact tcggctttac tgtaaagggg ctgataatgt gatttttgag 1680  
agactttcaa aagactcaaa atatatggag gaaacattat gccatctgga atactttgcc 1740  
acggaaggct tgcggactct ctgtgtggct tatgtctgac tctctgagaa tgagtatgag 1800  
gagtggttga aagtctatca ggaagccagc accatatiga aggacagagc tcaacggttg 1860  
gaagagtgtt acgagatcat tgagaagaat ttgtctctac ttggagccac agccatagaa 1920  
gatcgccctc aagcaggagt tccagaaacc atcgcaacac tgttgaaggc agaaattaaa 1980  
atatgggtgt tgacaggaga caaacaagaa actgcgattt atatagggtt ttcttgcga 2040  
tiggatctgc agaatatggc ctttatccta ttgaaggagg actcttttga tgccacaagg 2100  
gcagccattt ctacgactg cactgacctt gggaatttgc tgggcaagga aaatgacgtg 2160  
gccctcatca tcgatggcca cacctgaag tacgcgctct ccttcgaagt ccggaggagt 2220  
ttcttggatt tggcactctc gtgcaaagcg gtcatatgct gcagagtgtc tcctctgcag 2280  
aagctctgaga tagtggatgt ggtgaagaag cgggtgaagg ccatcaccct cgccatcgga 2340  
gacggcgcca acgatgtcgg gatgatccag acagcccacg tgggtgtggg aatcagtggg 2400  
aatgaaggca tgcaggccac caacaactcg gattacgcca tcgcacagtt ttctactta 2460

gagaagcttc tgttgggtca tggagcctgg agctacaacc gggtagacaa gtgcatcttg 2520  
tactgcttct ataagaacgt ggtcctgtat attattgagc ttiggttcgc ctttgttaat 2580  
ggattttctg ggcagatiti atttgaacgt tggtagcatcg gccgtgacaa tgtgattttc 2640  
accgctttgc cgcccttcac tctgggaatc tttagagaggt cttgcacica ggagagcatg 2700  
ctcaggtttc cccagctcta caaaatcacc cagaatggcg aaggcttcaa cacaaagggt 2760  
ttctggggtc actgcatcaa cgccttggtc cactccctca tctcttctg gtttcccatg 2820  
aaagctctgg agcatgatac tgtgttgaca agtggtcatg ctaccgacta tttatttgtt 2880  
ggaaatatig tttacacata tgttgttgtt actgtttgtc tgaaagctgg tttagagacc 2940  
acagcttggc ctaaattcag tcatctggct gtctggggaa gcatgctgac ctggctgggt 3000  
ttttttggca tctactcgac catctggccc accattccca ttgctccaga tatgagagga 3060  
caggcaacta tggcctgag ctccgcacac ttctggttgg gattatttct ggttcctact 3120  
gccgttttga ttgaagatgt ggcatggaga gcagccaagc acaccigcaa aaagacattg 3180  
ctggaggagg tgcaggagct ggaaaccaag tctcgagtcc tgggaaaagc ggtgctgcgg 3240  
gatagcaatg gaaagaggct gaacgagcgc gaccgcctga tcaagaggct gggccggaag 3300  
acgccccga cgctgttccg gggcagctcc ctgcagcagg gcgtcccgca tgggtatgct 3360  
ttttctcaag aagaacacgg agctgttagt caggaagaag tcatccgtgc ttatgacacc 3420  
accaaaaaga aatccaggaa gaaa 3444

<210> 44

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 44

ctttgggcta taagaaggca gag

23

<210> 45

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 45

aggtttgcga gggaatatgt aact

24

<210> 46

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 46

atttaggtga cactatag

18

<210> 47

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 47

aatacgactc actataggg

19

<210> 48

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 48

tcaagaagat ggacaccacc tcag

24

<210> 49

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 49

gccagtttat gaaaagggct tgag

24

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 50

ttcgccagga ccacaccagc aact

24

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer



<400> 51

tcgcagtttc ttgtttgtct ccig

24

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 52

accicaggca atgtgttatg

20

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 53

agcgatggga caggaacaaa

20

<210> 54

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 54

agtigctggt gtggtcctgg cgaa

24

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 55

ctgggcagat tttatttgaa

20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 56

cctgagctcc gcacatttct

20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 57

cataacacat tgcctgaggt

20

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 58

ttcaaataaa atctgcccag

20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 59

agaagtgtgc ggagctcagg

20

<210> 60

<211> 3643

<212> DNA

<213> Human

<400> 60

ctttgggcta taagaaggca gaggatgaga tgtcccgggc cacgtctgtt ggagaccagc 60  
tggaggcacc cgcccgcacc atttacctca accaaccgca tctcaacaaa ttccgcgaca 120  
accagatcag tacggccaag tacagcgtgt tgacatttct acctcgattc ttgtatgagc 180  
agattagaag agctgcta at gccttctttc tcttcattgc cttattacag caaattccag 240  
atgtatctcc aacaggaaga tataccaccc tgggtgccatt gatcattatt ttaacaattg 300  
caggcatcaa agagattgta gaagatttta agcgacacaa ggcagacaat gcagttaaca 360  
aaaagaaaac aatagtgtta agaaatggta tgtggcatac cattatgtgg aaagaggtgg 420

cagtgggaga catttgaag gtcgtcaatg ggcagtatct tccagcagat ggggtccigc 480  
tgtcatccag tgaaccicag gcaatgtgtt atgttgaac agctaattctg gatggggaga 540  
cgaaccttaa aatcgtcag gggttgagtc acactgctga catgcaaaca cgtgaagttc 600  
tgatgaagtt atctggaact atagagtgtg aagggcccaa ccgccacctc tatgacttca 660  
ctggaaactt gaacttagat gggaaaagcc ttgttgcctt tgggcctgac cagatcttat 720  
taagaggtag acagcttaga aatactcagt gggcttttgg catagtgtt tatactggac 780  
acgacaccaa acicatgcag aattcaacca aagcgctctt caagagatca aatgttgaga 840  
aggtagactaa cgtgcagatc ctgggtgtgt ttggcatcct ctgggtcatg gccttggtag 900  
gctcggcggg ggccctgtac tggaaacaggt ctcatggtag aaagaactgg tacatcaaga 960  
agatggacac cacctcagat aattttggat acaacctact gacgttcatc atcttataca 1020  
acaatcttat tccatcagt ctgttggtag ctcttgaggt tgtgaagtat actcaagccc 1080  
ttttcataaa ctgggacaca gatatgtatt atataggaaa tgacactcct gccatggcca 1140  
ggacatcaaa ccttaatgaa gagcttgggc aggtgaaata tctcttttct gacaagactg 1200  
gaacgcttac atgcaatatc atgaacttta agaagtgcag cattgccgga gtaacctatg 1260  
gtcacttccc agaattggca agagagccgt cttcagatga ctctgtcgg atgcctcctc 1320  
cctgtatga ttctgtgac ttigtatgacc ccaggctgtt gaagaacatt gaggatcgcc 1380  
atcccacagc cccttgcat caggagtcc tcaccttct ggccgtgtgc cacacggttg 1440  
ttctgagaa ggatggagat aacatcatct accaggcctc tccccagat gaagctgctt 1500  
tggtagaagg agctaaaaag ctgggccttg tcttcacagc cagaacacca ttctcagtca 1560  
tcatagaagc gatgggacag gaacaaacat tcggaatcct taatgtcctg gaattttcta 1620  
gtgacagaaa aagaatgtct gtaattgttc gaactccttc aggacgactt cggctttact 1680  
glaaaggggc tgataatgtg atttttgaga gactttcaaa agactcaaaa tatatggagg 1740  
aaacattatg ccatctggaa tactttgcca cggaaggctt gcggactctc tgtgtggctt 1800  
atgtctatct ctctgagaat gagtatgagg agtggctgaa agtctatcag gaagccagca 1860  
ccatattgaa ggacagagct caacggttgg aagagtgtta cgagatcatt gagaagaatt 1920  
tgctgtact tggagccaca gccatagaag atcgcttca agcaggagtt ccagaaacca 1980  
tcgcaacact gttgaaggca gaaattaaaa tatgggtgtt gacaggagac aaacaagaaa 2040  
ctgcgattaa tatagggtat tcttccgat tggtagcga gaatatggcc ctatcttat 2100  
tgaaggagga ctctttggat gccacaaggg cagccattac tcagcactgc actgaccttg 2160

ggaatttgct gggcaaggaa aatgacgigg cctcatcat cgatggccac accctgaagi 2220  
acgcgctctc cticgaagtc cggaggagtt tcctggattt ggcactctcg tgcaaagcgg 2280  
tcataigctg cagagtgtct cctctgcaga agcttgagat agtggatgtg gtgaagaagc 2340  
gggtgaaggc catcaccttc gccatcggag acggcgccaa cgatgtcggg atgatccaga 2400  
cagcccacgt ggggtgggga atcagtggga atgaaggcat gcaggccacc aacaactcgg 2460  
attacgccat cgcacagttt tcctacttag agaagcttct gttaggttcat ggagccitga 2520  
gctacaaccg ggtgaccaag tgcatttgt actgcttcta taagaacgtg gtccigtata 2580  
ttattgagct ttggttcgcc ttgttaatg gattttctgg gcagatttta ttigaacgtt 2640  
ggtgcatcgg ccgtlacaat gtgattttca ccgctttgcc gcccttact ctgggaatct 2700  
ttgagaggtc ttgcactcag gagagcatgc tcaggtttcc ccagctctac aaaatcacc 2760  
agaatggcga aggcctcaac acaaaggttt tctggggctca ctgcatcaac gccttggctc 2820  
actccctcat cctcttctgg ttcccaatga aagctctgga gcatgatact gtgttgacaa 2880  
gtggtcatgc taccgactat ttatttgttg gaaatatgtt ttacacatat gtgttgttta 2940  
ctgtttgtct gaaagctggt ttggagacca cagcttggac taaattcagt catctggctg 3000  
tctggggaag catgtgacc tggctggtgt tttttggcat ctactcgacc atctggccca 3060  
ccattcccat tgcctcagat atgagaggac aggcaactat ggtcctgagc tccgcacact 3120  
tctggttggg attatttctg gtccctactg cctgtttgat tgaagatgtg gcatggagag 3180  
cagccaagca cacctgcaa aagacattgc tggaggaggt gcaggagctg gaaaccaagt 3240  
ctcgagtcct gggaaaagcg gtgctgcggg atagcaatgg aaagaggctg aacgagcgcg 3300  
accgcctgat caagaggctg ggccggaaga cgcctccgac gctgttccgg ggcagctccc 3360  
tgcagcaggg cgtcccgcat gggtaigctt ttctcaaga agaacacgga gctgttagtc 3420  
aggaagaagt catccgtgct tatgacacca caaaaagaa atccaggaag aaataagaca 3480  
tgaattttcc tgactgatct taggaaagag attcagtttg ttgcaccag tgttaacaca 3540  
tctttgtcag agaagactgg cgtcagcagc caaaacacca ggaaacacat ttctgtggcc 3600  
ttagccaagc agtttgttag ttacatatc cctcgcaaac cta 3643

<210> 61

<211> 3643

<212> DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 61

cittgggcta taagaaggca gaggatgaga tgtcccgggc cacgtctggt ggagaccagc 60  
tggaggcacc cgcccgccacc atttaccica accaaccgca tctcaacaaa ttccgcgaca 120  
accagatcag tacggccaag tacagcgtgt tgacatttct acctcgattc ttgtatgagc 180  
agattagaag agctgctaata gccttcttct tcttcattgc cttattacag caaatccag 240  
atgtatctcc aacaggaaga tataccaccc tgggtgccatt gatcattatt ttaacaattg 300  
caggcatcaa agagattgta gaagatttta agcgacacaa ggcagacaat gcagttaaca 360  
aaaagaaaac aatagtgtta agaaatggta tgtggcatac cattatgtgg aaagagggtg 420  
cagtgggaga cattgtgaag gtcgtcaatg ggcagtatct tccagcagat gtggctcgtc 480  
tgtcatccag tgaacctcag gcaatgtgtt atgttgaaac agctaattct gatggggaga 540  
cgaaccttaa aatactcag ggtttgagtc acactgccta catgcaaaca cgtgaagtgc 600  
tgatgaagtt atctggaact atagagtgtg aagggcccaa ccgccacctc tatgactica 660  
ctggaaactt gaacttagat gggaaaagcc ttgttgcctt tgggcctgac cagatcttat 720  
taagagggtac acagcttaga aatactcagt gggctcttgg catagtgtt tatactggac 780  
acgacaccaa actcatgcag aattcaacca aagcgccctct caagagatca aatgttgaga 840  
agggtactaa cgtgcagatc ctgggtgtgt ttggcatcct ctgggtcatg gccttgggtg 900  
gctcggcggg ggccctgtac tggaacaggt ctcatgggtg aaagaactgg tacatcaaga 960  
agatggacac cacctcagat aattttggat acaacctact gacgttcac atcttataca 1020  
acaatcttat tccatcagt ctgttgggtg ctcttgaggt tgtgaagtat actcaagccc 1080  
ttttcataaa ctgggacaca gatatgtatt atataggaaa tgacactcct gccatggcca 1140  
ggacatcaaa ccttaatgaa gagcttgggc aggtgaaata tctcttttct gacaagactg 1200  
gaacgcttac atgcaatatc atgaacttta agaagtgcag cattgccgga gtaacctatg 1260  
gtcacttccc agaattggca agagagccgt cttcagatga ctctgtcgg atgcctcctc 1320  
cctgtagtga ttctgtgac ttgtatgacc ccaggctgtt gaagaacatt gaggatcgcc 1380  
atcccacagc ccttgcatt caggagtcc tacccttct ggccgtgtgc cacacggttg 1440  
ttcttgagaa ggatggagat aacatcatct accaggcctc tccccagat gaagctgctt 1500  
tggtgaaagg agctaaaaag ctgggccttg tcttcacagc cagaacacca ttctcagtca 1560  
tcatagaagc gatgggacag gaacaaacat tcggaatcct taatgtcctg gaattttcta 1620

gigacagaaa aagaatgtct gtaattgttc gaactccttc aggacgactt cggcttttact 1680  
gtaaaggggc igataatgtg atttttgaga gactttcaaa agactcaaaa tataatggagg 1740  
aaacattatg ccatctggaa tactttgcca cggaaggcct gcggaactctc tgtgtggcctt 1800  
atgctgatct ctctgagaat gagtatgagg agtggcigaa agtctatcag gaagccagca 1860  
ccatattgaa ggacagagct caacggttgg aagagtgtta cgagatcatt gagaagaatt 1920  
tgctgtctact tggagccaca gccatagaag atcgccctca agcaggagtt ccagaaacca 1980  
tcgcaacact gttgaaggca gaaattaaaa tatgggtgtt gacaggagac aaacaagaaa 2040  
ctgcgattaa tatagggtat tcttccgat tggatcgca gaatatggcc cttatcttat 2100  
tgaaggagga ctctttggat gccacaaggg cagccattac tcagcactgc actgaccttg 2160  
ggaatttgct gggcaaggaa aatgacgtgg cctcatcat cgaiggccac acctgaagt 2220  
acgcgctctc cttcgaagtc cggaggagtt tcttggattt ggcactctcg tgcaaagcgg 2280  
tcatatgctg cagagtgtct cctctgcaga agtctgagat agtggatgtg gtgaagaagc 2340  
gggtgaaggc catcacctc gccatcggag acggcgccaa cgatgtcggg atgatccaga 2400  
cagcccacgt ggggtgtggga atcagtggga atgaaggcat gcaggccacc aacaactcgg 2460  
attacgccat cgcacagttt tcttacttag agaagcttct gttggttcat ggagccigga 2520  
gtacaaccg ggtgaccaag tgcacttgt actgcttcta taagaacgtg gtccgtgata 2580  
ttattgagct ttggttcgcc ttgtttaatg gatcttctgg gcagatttta ttgaacgtt 2640  
gggtgcatcg cctgtacaat gtgattttca ccgctttgcc gcccttact ctgggaatct 2700  
ttgagaggtc ttgcactcag gagagcatgc tcaggtttcc ccagctctac aaaatcacc 2760  
agaatggcga aggtttcaac acaaaggttt tctggggta ctgcatcaac gccttggctc 2820  
actccctcat cctcttctgg ttcccatga aagctctgga gcatgatact gtgttgacaa 2880  
gtggatcatg taccgactat ttatttgttg gaaatatgt ttacacatat gttgttgtta 2940  
ctgtttgtct gaaagctggt ttggagacca cagcttggac taaattcagt catctggctg 3000  
tctggggaag catgtgacc tggctggtgt tttttggcat ctactcgacc atctggccca 3060  
ccattcccat tgtccagat atgagaggac aggcaactat ggtcctgagc tccgcacact 3120  
tctggttggg attatttctg gtctctactg cctgtttgat tgaagatgtg gcatggagag 3180  
cagccaagca cacctgcaa aagacattgc tggaggaggt gcaggagctg gaaaccaagt 3240  
ctcgagtcct gggaaaagcg gtgctgcggg atagcaatgg aaagaggctg aacgagcgcg 3300  
accgctgat caagaggctg ggccggaaga cgccccgac gctgttccgg ggcagctccc 3360

tgcagcaggg cgtcccgcat gggatgcit tttctcaaga agaacacgga gctgttagtc 3420  
aggaagaagt catccgtgct tatgacacca ccaaaaagaa atccaggaag aaataagaca 3480  
tgaattttcc tgactgatct taggaaagag attcagtttg ttgcaccag tgtaacaca 3540  
tctttgtcag agaagactgg cgtcagcagc caaaacacca ggaaacacat tttgtggcc 3600  
ttagccaagc agttgttag ttacatattc cctcgcaaac cta 3643

<210> 62

<211> 3444

<212> DNA

<213> Human

<400> 62

atgtcccggg ccacgtctgt tggagaccag ctggaggcac ccgcccgcac catttacctc 60  
aaccaaccgc atctcaacaa attccgcgac aaccagatca gtacggccaa gtacagcgtg 120  
ttgacatttc tacctcgatt ctgtatgag cagattagaa gagctgctaa tgccttcttt 180  
ctcttcattg ccttattaca gcaaatcca gatgtatctc caacaggaag atataccacc 240  
ctgggtgccat tgatcattat ttaacaatt gcaggcatca aagagattgt agaagatttt 300  
aagcgacaca aggcagacaa tgcagttaac aaaaagaaaa caatagtgtt aagaaatggt 360  
atgtggcata ccattatgtg gaaagaggig gcagtgggag acattgtgaa ggicgtcaat 420  
gggcagtatc ticcagcaga tgtggtcctg ctgtcatcca gtgaacctca ggcaatgtgt 480  
tatgttgaaa cagctaatct ggatggggag acgaacctta aaatacgtca gggtttgagt 540  
cacactgctg acatgcaaac acgtgaagtt ctgatgaagt tatctggaac tatagagtgt 600  
gaagggccca accgccacct ctatgacttc actggaaact tgaacttaga tgggaaaagc 660  
cttgttgccc ttgggcctga ccagatctta ttaagaggta cacagcttag aaatactcag 720  
tgggtctttg gcatagtgtt ttatactgga cagcacacca aactcatgca gaattcaacc 780  
aaagcgcctc tcaagagatc aaatgttgag aaggtgacta acgtgcagat cctgggtgtg 840  
tttggcatcc tcttggatcat ggccctgggtg agctcggcgg gggccctgta ctggaacagg 900  
tctcatgggtg aaaagaactg gtacatcaag aagatggaca ccacctcaga taattttgga 960  
tacaacctac tgacgttcat catcttatac aacaatctta ttcccatcag tctgttgggtg 1020  
actcttgagg ttgtgaagta tactcaagcc cttttcataa actgggagac agatatgtat 1080



tatataggaa atgacactcc tgccatggcc aggacatcaa accttaatga agagcttggg 1140  
caggtagaat atcctcttcc tgacaagact ggaacgctta catgcaatat catgaacttt 1200  
aagaagtgca gcattgccgg agtaacctat ggtaacttcc cagaattggc aagagagccg 1260  
tcttcagatg acttctgtcg gatgcctcct cctgttagig attcctgtga ctttgatgac 1320  
cccaggctgt tgaagaacat tgaggatcgc catccacag ccccttgcac tcaggagtcc 1380  
ctcacccttc tggccgtgtg ccacacgggt gtctctgaga aggatggaga taacatcatc 1440  
taccaggcct ctccccaga tgaagctgct ttggtagaag gagctaaaaa gctgggcttt 1500  
gtcttcacag ccagaacacc attctcagtc atcatagaag cgatgggaca ggaacaaaca 1560  
tttggaaacc ttaatgtcct ggaattttct agtgacagaa aaagaatgtc tgtaattgtt 1620  
cgaactcctt caggacgact tcggctttac tgltaaagggg ctgataatgt gatttttgag 1680  
agactttcaa aagactcaaa atatatggag gaaacattat gccatctgga atactttgcc 1740  
acggaaggct tgcggactct ctgigtggct tatgctgac tctctgagaa tgagtatgag 1800  
gagtggctga aagtctatca ggaagccagc accatatga aggacagagc tcaacggttg 1860  
gaagagtgtt acgagatcat tgagaagaat ttgctgctac ttggagccac agccatagaa 1920  
gatcgccctc aagcaggagt tccagaaacc atcgcaacac tgttgaaggc agaaattaaa 1980  
atatgggtgt tgacaggaga caaacaagaa actgcgatta atatagggtt ttcttgccga 2040  
ttggtatcgc agaatatggc cttatccta ttgaaggagg actctttgga tgccacaagg 2100  
gcagccattt ctcagcactg cactgacctt gggaatttgc tgggcaagga aatgacgtg 2160  
gccctcatca tcgatggcca caccctgaag tacgcgctct ccttcgaagt ccggaggagt 2220  
ttcctggatt tggcactctc gtgcaaagcg gtcatatgct gcagagtgtc tcctctgcag 2280  
aagtctgaga tagtggatgt ggtgaagaag cgggtgaagg ccatcacctt cgccatcgga 2340  
gacggcgcca acgatgtcgg gatgatccag acagcccacg tgggtgtggg aatcagtggg 2400  
aatgaaggca tgcaggccac caacaactcg gattacgcca tcgcacagtt ttctacttta 2460  
gagaagcttc tgttgggtca tggagcctgg agctacaacc gggtgaccaa gtgcatcttg 2520  
tactgcttct ataagaacgt ggtcctgtat attattgagc ttggttcgc ctttgttaat 2580  
ggattttctg ggcagatttt atttgaacgt tggatcatcg gcctgtacaa tgtgattttc 2640  
accgctttgc cgcccttcac tctgggaatc tttagaggtt ctgacttca ggagagcatg 2700  
ctcaggtttc cccagctcta caaaatcacc cagaatggcg aaggcttcaa cacaaagggt 2760  
ttctggggtc actgcatcaa cgccctgggc cactccctca tcctctcttg gtttcccatg 2820

aaagctctgg agcatgatac tgtgttgaca agtgggtcatg ctaccgacta tttatttggt 2880  
ggaaatatig tttacacata tgttgttggt actgtttgtc tgaaagctgg tttggagacc 2940  
acagcttggc ctaaattcag tcatctggct gtciggggaa gcatgcigac ctggctggig 3000  
ttttttggca tctactcgac catctggccc accattccca ttgctccaga tatgagagga 3060  
caggcaacta tggctctgag ctccgcacac ttctggttgg gattatttct ggttcctact 3120  
gccgtgttga ttgaagatgt ggcatggaga gcagccaagc acacctgcaa aaagacattg 3180  
ctggaggagg tgcaggagct ggaaaccaag tctcagatcc tgggaaaagc ggtgctgcgg 3240  
gatagcaatg gaaagaggct gaacgagcgc gaccgcctga tcaagaggct gggccggaag 3300  
acgccccga cgctgttccg gggcagctcc ctgcagcagg gcgtcccgca tgggtatgct 3360  
ttttctcaag aagaacacgg agctgttagt caggaagaag tcatccgtgc ttatgacacc 3420  
accaaaaaga aatccaggaa gaaa 3444

<210> 63

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 63

cgcagaatat ggcccttata c

21

<210> 64

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 64

cattttcctt gccagcaaa

20

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Probe

&lt;400&gt; 65

ccattactca gcactgcact gaccttgg

28

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 791

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 66

Met Lys Ala His Pro Lys Glu Met Val Pro Leu Met Gly Lys Arg Val

5

10

15

Ala Ala Pro Ser Gly Asn Pro Ala Val Leu Pro Glu Lys Arg Pro Ala

20

25

30

Glu Ile Thr Pro Thr Lys Lys Ser Ala His Phe Phe Leu Glu Ile Glu

35

40

45

Gly Phe Glu Pro Asn Pro Thr Val Ala Lys Thr Ser Pro Pro Val Phe

50

55

60

Ser Lys Pro Met Asp Ser Asn Ile Arg Gln Cys Ile Ser Gly Asn Cys

65

70

75

80

Asp Asp Met Asp Ser Pro Gln Ser Pro Gln Asp Asp Val Thr Glu Thr

85

90

95

Pro Ser Asn Pro Asn Ser Pro Ser Ala Gln Leu Ala Lys Glu Glu Gln

100

105

110

Arg Arg Lys Lys Arg Arg Leu Lys Lys Arg Ile Phe Ala Ala Val Ser  
115 120 125

Glu Gly Cys Val Glu Glu Leu Val Glu Leu Leu Val Glu Leu Gln Glu  
130 135 140

Leu Cys Arg Arg Arg His Asp Glu Asp Val Pro Asp Phe Leu Met His  
145 150 155 160

Lys Leu Thr Ala Ser Asp Thr Gly Lys Thr Cys Leu Met Lys Ala Leu  
165 170 175

Leu Asn Ile Asn Pro Asn Thr Lys Glu Ile Val Arg Ile Leu Leu Ala  
180 185 190

Phe Ala Glu Glu Asn Asp Ile Leu Gly Arg Phe Ile Asn Ala Glu Tyr  
195 200 205

Thr Glu Glu Ala Tyr Glu Gly Gln Thr Ala Leu Asn Ile Ala Ile Glu  
210 215 220

Arg Arg Gln Gly Asp Ile Ala Ala Leu Leu Ile Ala Ala Gly Ala Asp  
225 230 235 240

Val Asn Ala His Ala Lys Gly Ala Phe Phe Asn Pro Lys Tyr Gln His  
245 250 255

Glu Gly Phe Tyr Phe Gly Glu Thr Pro Leu Ala Leu Ala Ala Cys Thr  
260 265 270

Asn Gln Pro Glu Ile Val Gln Leu Leu Met Glu His Glu Gln Thr Asp  
275 280 285

Ile Thr Ser Arg Asp Ser Arg Gly Asn Asn Ile Leu His Ala Leu Val  
290 295 300

Thr Val Ala Glu Asp Phe Lys Thr Gln Asn Asp Phe Val Lys Arg Met  
305 310 315 320

Tyr Asp Met Ile Leu Leu Arg Ser Gly Asn Trp Glu Leu Glu Thr Thr  
325 330 335

Arg Asn Asn Asp Gly Leu Thr Pro Leu Gln Leu Ala Ala Lys Met Gly

340 345 350  
Lys Ala Glu Ile Leu Lys Tyr Ile Leu Ser Arg Glu Ile Lys Glu Lys  
355 360 365  
Arg Leu Arg Ser Leu Ser Arg Lys Phe Thr Asp Trp Ala Tyr Gly Pro  
370 375 380  
Val Ser Ser Ser Leu Tyr Asp Leu Thr Asn Val Asp Thr Thr Thr Asp  
385 390 395 400  
Asn Ser Val Leu Glu Ile Thr Val Tyr Asn Thr Asn Ile Asp Asn Arg  
405 410 415  
His Glu Met Leu Thr Leu Glu Pro Leu His Thr Leu Leu His Met Lys  
420 425 430  
Trp Lys Lys Phe Ala Lys His Met Phe Phe Leu Ser Phe Cys Phe Tyr  
435 440 445  
Phe Phe Tyr Asn Ile Thr Leu Thr Leu Val Ser Tyr Tyr Arg Pro Arg  
450 455 460  
Glu Glu Glu Ala Ile Pro His Pro Leu Ala Leu Thr His Lys Met Gly  
465 470 475 480  
Trp Leu Gln Leu Leu Gly Arg Met Phe Val Leu Ile Trp Ala Met Cys  
485 490 495  
Ile Ser Val Lys Glu Gly Ile Ala Ile Phe Leu Leu Arg Pro Ser Asp  
500 505 510  
Leu Gln Ser Ile Leu Ser Asp Ala Trp Phe His Phe Val Phe Phe Ile  
515 520 525  
Gln Ala Val Leu Val Ile Leu Ser Val Phe Leu Tyr Leu Phe Ala Tyr  
530 535 540  
Lys Glu Tyr Leu Ala Cys Leu Val Leu Ala Met Ala Leu Gly Trp Ala  
545 550 555 560  
Asn Met Leu Tyr Tyr Thr Arg Gly Phe Gln Ser Met Gly Met Tyr Ser  
565 570 575

Val Met Ile Gln Lys Val Ile Leu His Asp Val Leu Lys Phe Leu Phe  
580 585 590

Val Tyr Ile Val Phe Leu Leu Gly Phe Gly Val Ala Leu Ala Ser Leu  
595 600 605

Ile Glu Lys Cys Pro Lys Asp Asn Lys Asp Cys Ser Ser Tyr Gly Ser  
610 615 620

Phe Ser Asp Ala Val Leu Glu Leu Phe Lys Leu Thr Ile Gly Leu Gly  
625 630 635 640

Asp Leu Asn Ile Gln Gln Asn Ser Lys Tyr Pro Ile Leu Phe Leu Phe  
645 650 655

Leu Leu Ile Thr Tyr Val Ile Leu Thr Phe Val Leu Leu Leu Asn Met  
660 665 670

Leu Ile Ala Leu Met Gly Glu Thr Val Glu Asn Val Ser Lys Glu Ser  
675 680 685

Glu Arg Ile Trp Arg Leu Gln Arg Ala Arg Thr Ile Leu Glu Phe Glu  
690 695 700

Lys Met Leu Pro Glu Trp Leu Arg Ser Arg Phe Arg Met Gly Glu Leu  
705 710 715 720

Cys Lys Val Ala Glu Asp Asp Phe Arg Leu Cys Leu Arg Ile Asn Glu  
725 730 735

Val Lys Trp Thr Glu Trp Lys Thr His Val Ser Phe Leu Asn Glu Asp  
740 745 750

Pro Gly Pro Val Arg Arg Thr Ala Asp Phe Asn Lys Ile Gln Asp Ser  
755 760 765

Ser Arg Asn Asn Ser Lys Thr Thr Leu Asn Ala Phe Glu Glu Val Glu  
770 775 780

Glu Phe Pro Glu Thr Ser Val  
785 790

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 2373

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 67

```
atgaaagccc accccaagga gatggcgcct ctcatgggca agagagttagc tgccccccagt 60
gggaaccctg ccgtcctgcc agagaagagg ccggcggaga tcacccccac aaagaagagt 120
gcacacttct tcctggagat agaagggttt gaaccaacc ccacagttagc caagacctct 180
cctcctgtct tctccaagcc catggattcc aacatccggc agtgcatctc tggtaactgt 240
gatgacatgg actcccccca gtctcctcaa gatgatgtga cagagacccc atccaatccc 300
aacagcccca gtgcacagct ggccaaggaa gagcagagga ggaaaaagag gcggctgaag 360
aagcgcatct ttgcagccgt gtctgagggc tgcgtggagg agttggtaga gttgctggtg 420
gagctgcagg agctttgcag gcggcgccat gatgaggatg tgcttgactt cctcatgcac 480
aagctgacgg cctccgacac ggggaagacc tgctgatga aggccttggt aaacatcaac 540
cccaacacca aggagatcgt gcggatcctg ctgaccttg ctgaagagaa cgacatcctg 600
ggcagggtca tcaacgccga gtacacagag gaggcctatg aagggcagac ggcgctgaac 660
atcgccatcg agcggcggca gggggacatc gcagccctgc tcatcgccgc cggcgccgac 720
gtcaacgcgc acgccaaggg gcccttcttc aacccaagt accaacacga aggcctctac 780
ttcgggtgaga cgcccttggc cctggcagca tgcaccaacc agcccgagat tgtgcagctg 840
ctgatggagc acgagcagac ggacatcacc tcgcgggact cagaggcaa caacatcctt 900
cacgccctgg tgaccgtggc cgaggactc aagacgcaga atgactttgt gaagcgcatg 960
tacgacatga tctactgcg gagtggcaac tgggagctgg agaccactcg caacaacgat 1020
ggcctcacgc cgctgcagct ggccgccaag atgggcaagg cggagatcct gaagtacatc 1080
ctcagtcgtg agatcaagga gaagcggctc cggagcctgt ccaggaagtt caccgactgg 1140
gcgtacggac ccgtgtcatc ctccctctac gacctacca acgtggacac caccacggac 1200
aactcagtgc tggaaatcac tgtctacaac accaacatcg acaaccggca tgagatgctg 1260
accttggagc cgctgcacac gctgctgcat atgaagtggg agaagtttgc caagcacatg 1320
ttctttctgt ccttctgcct ttatttcttc tacaacatca ccttgaccct cgtctcgtac 1380
taccgcccc gggaggagga ggccatcccg cacccttgg ccttgacgca caagatgggg 1440
```

tggctgcagc tcctagggag gatgtttgtg ctcatctggg ccatgtgcat ctctgtgaaa 1500  
 gagggcattg ccatcttccct gctgagaccc tcggatctgc agtccatcct ctcggaatgcc 1560  
 tggttccact ttgtcttttt tatccaagct gtgcttgtga tactgtctgt ctctctgtac 1620  
 ttgtttgcct acaaagagia cctcgccctgc ctctgtctgg ccatggccct gggctgggcg 1680  
 aacatgcctt actatagcg gggtttccag tccatgggca tgtacagcgt catgatccag 1740  
 aaggtcattt tgcattgat tctgaagttc ttgtttgtat atatcgtgtt ttgtcttga 1800  
 ttgtggatag ccttggccctc gctgatcgag aagtgtccca aagacaacaa ggactgcagc 1860  
 tcctacggca gcttcagcga cgcagtctg gaactcttca agctcaccat aggcctgggt 1920  
 gacctgaaca tccagcagaa ctccaagtat cccattctct ttctgttccct gctcatcacc 1980  
 tatgtcatcc tcacctttgt tctcctcctc aacatgctca ttgctctgat gggcgagact 2040  
 gtggagaacg tctccaagga gagcgaacgc atctggcgcc tgcagagagc caggaccatc 2100  
 ttggagtttg agaaaatgtt accagaatgg ctgaggagca gattccggat gggagagctg 2160  
 tgcaaagtgg ccgaggatga ttccgactg tgtttgcgga tcaatgaggt gaagtggact 2220  
 gaalgaaga cgcacgtctc ctcccttaac gaagaccgga ggccgtgaag acgaacagca 2280  
 gatitcaaca aaatccaaga ttcttccagg aacaacagca aaaccactct caatgcattt 2340  
 gaagaagtcg aggaattccc ggaaacctcg gtg 2373

<210> 68

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 68

ccatcctaatac gactcact atagggc

27

<210> 69

<211> 23

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 69

cgggggcggt agtacgagac gag

23

<210> 70

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 70

actcactata gggctcgagc ggc

23

<210> 71

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 71

cagcaaaggc aagcaggatc cgcactat

28

<210> 72

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 72

caggaaacag ctatgac

17

<210> 73

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 73

gtaaaacgac ggccag

16

<210> 74

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 74

gtgcactggg gctgttggga ttggatgg

28

<210> 75

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 75

atggctgggtg aggttcctggg tggtcgtg

28

<210> 76

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 76

tgaggaggag aacaaagggtg aggatgaca

29

<210> 77

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 77

actgcgtcgc tgaagctgcc gtagggag

27

<210> 78

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 78

tccattctc tttctgttcc tgcctcalca

29

<210> 79

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 79

tgatcaccac acccttggtc tctcctca

29

<210> 80

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 80

aacgaagacc cggggcctgt aagacgaa

28

<210> 81

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 81

ccgccgctc agccacagtc c

21

<210> 82

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 82

gctctgggtt cgccttctac ac

22

<210> 83

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 83

atgaaagccc accccaagga gatg

24

<210> 84

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 84

ctacaccgag gtttccggga attc

24

<210> 85

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 85

tggagcacga gcagacggac atca

24

<210> 86

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 86

gcggatcctg ctigcctttg ctgaa

25

<210> 87

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 87

cgcgggactc acgaggcaac aaca

24

<210> 88

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 88

ggctgggcga acatgcicta ctat

24

<210> 89

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 89

cgctgctgca tatgaagtgg aagaagttt

29

<210> 90

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 90

cagacggaca tcacctgcgc ggactcacg

29

<210> 91

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 91

gagagctgtg caaagtggcc gaggatgat

29

<210> 92

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 92

gagtcgccg aggtgatgtc cgtctgct

28

<210> 93

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 93

caactcctcc acgcagccct cagacacg

28

<210> 94

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 94

gcctgacttc ctcatgcaca a

21

<210> 95



<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 95

aggccitcat caggcaggt

19

<210> 96

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 96

ctgacggcct ccgacacggg

20

<210> 97

<211> 697

<212> DNA

<213> Human

<400> 97

tgcaatgaga gcttcccgcc gcctcagcca cagtcacc cgggggcctt gggccccaga 60  
catgcggtga tctcaggga agggttgcca cgaccacca gaacctcacc agccatgaaa 120  
gcccaccca aggagatggt gcctctcatg ggcaagagag ttgctgcccc cagtgggaac 180  
cctgccgtcc tgccagagaa gaggccggcg gagatcaccc ccacaaagaa gagtgcacac 240  
ttcttcttgg agatagaagg gtttgaaccc aacccacag ttgccaagac ctctctctct 300  
gtcttctcca agcccatgga ttccaacatc cggcagtga tctcttgtaa ctgtgatgac 360  
atggactccc ccagctctcc tcaagatgat gtgacagaga ccccatccaa tcccaacagc 420

cccagtcac agctggccaa ggaagagcag aggaggaaaa agaggcggct gaagaagcgc 480  
atctttgcag ccgigtctga gggctgcgtg gaggagtgg tagagtgtct ggtggagctg 540  
caggagcttt gcaggcggcg ccatgatgag gatgtgcctg acttctcat gcacaagctg 600  
acggcctccg acacggggaa gacctgcctg atgaaggcct tgttaaacaat caaccccaac 660  
accaaggaga tagtcggat cctgcttgcc ttgtctg 697

<210> 98

<211> 275

<212> DNA

<213> Human

<400> 98

ttcttgagca gtgcgtcatg gttgtgtgag ttgtgtcaa acttgctgta ggtctgcttg 60  
aggatctgcc cagtcggcg gctgccgtct tccagcctcc ccatcagcgt ttggatgcct 120  
tcctctaggt cctttaggag gtgatagta tcgctgtccc tgcaatgaga gcttcccgcc 180  
gccicagcca cagtcacc cgggggcctt gggcccaga catgcggtga tctcaggga 240  
agggttgac gaccaccag aaccicacca gccat 275

<210> 99

<211> 586

<212> DNA

<213> Human

<400> 99

agaagtttgc caagcacatg ttctttctgt cttctgtctt ttatttcttc tacaacatca 60  
ccctgaccct cgtctgtac taccgcccc gggaggagga ggccatcccg cacccttgg 120  
ccctgacgca caagatgggg tggctgcagc tcctaggag gatgtttgtg ctcatctggg 180  
ccatgtcat ctctgtgaaa gagggcattg ccatcttctt gctgagacc tcggatctgc 240  
agtcacatct ctcggatgcc tggttccact ttgtcttttt tatccaagct gtgcttgtga 300  
tactgtctgt ctctttgtac ttgtttgcct acaaagagta cctcgctgc ctctgtctgg 360  
ccatggccct gggctggcg aacatgcct actatacgcg gggtttccag tccatgggca 420

tgtacagcgt catgatccag aaggtaatt tgcatgatgt tctgaagttc ttgtttgtat 480  
atatcgtggt ttigcttgga ttggagtag ccttggcctc gctgatcgag aaggtccca 540  
aagacaacaa ggacgcagc tcctacggca gcttcagcga cgcagt 586

<210> 100

<211> 307

<212> DNA

<213> Human

<400> 100

tgtcatcctc acctttgttc tcctcctcaa catgctcatt gctctgatgg gcgagactgt 60  
ggagaacgtc tccaaggaga gcgaacgcat ctggcgcttg cagagagcca ggaccatctt 120  
ggagtttgag aaaatgttac cagaatggct gaggagcaga ttccggatgg gagagctgtg 180  
caaagtggcc gaggatgatt tccgactgtg ttgctggatc aatgaggatga agtggactga 240  
atggaagacg cagctctcct tccttaacga agaccgggg cctgtaagac gaacagcaga 300  
tttcaac 307

<210> 101

<211> 156

<212> DNA

<213> Human

<400> 101

aacgaagacc cggggcctgt aagacgaaca gcagatttca acaaaatcca agattcttcc 60  
aggaacaaca gcaaaaccac tctcaatgca ttigaagaag tcgaggaatt cccggaaacc 120  
tcggtgtaga agcggaaccc agagctgggtg tgcgcg 156

<210> 102

<211> 2376

<212> DNA

<213> Human

&lt;400&gt; 102

atgaaagccc accccaagga gatggtgcct ctcatgggca agagagttagc tgccccagtg 60  
gggaacccttg ccgtcctgcc agagaagagg ccggcggaga tcacccccac aaagaagagt 120  
gcacatttct tcttgagat agaagggttt gaaccaacc ccacagttagc caagacctct 180  
cttctgtct tctccaagcc catggattcc aacatccggc agtgcatctc tggtaactgt 240  
gatgacatgg actccccca gtctcttcaa gatgatgtga cagagacccc atccaatccc 300  
aacagcccca gtgcacagct ggccaaggaa gagcagagga ggaaaaagag gcggctgaag 360  
aagcgcatct ttgcagccgt gtctgagggc tgcgtggagg agttggtaga gttgctggtg 420  
gagctgcagg agctttgcag gcggcgccat gatgaggatg tgcctgactt cctcatgcac 480  
aagctgacgg cctccgacac ggggaagacc tgctgatga aggccttggt aaacatcaac 540  
cccaacacca aggagatcgt gcggatcctg ctgtccittg ctgaagagaa cgacatcctg 600  
ggcaggttca tcaacgccga gtacacagag gaggcctatg aagggcagac ggcgctgaac 660  
atcgccatcg agcggcggca gggggacatc gcagccctgc tcatcgccgc cggcgccgac 720  
gtcaacgcgc acgccaaggg ggcttcttc aacccaagt accaacacga aggttcttac 780  
ttcgggtgaga cgccccctggc cctggcagca tgcaccaacc agcccgagat tgtgcagctg 840  
ctgatggagc acgagcagac ggacatcacc tcgcgggact cagaggcaa caacatcctt 900  
cacgccctgg tgaccgiggc cgaggacttc aagacgcaga atgactttgt gaagcgcatg 960  
tacgacatga tcttactgcg gattggcaac tgggagctgg agaccactcg caacaacgat 1020  
ggcttcacgc cgctgcagct ggccgccaag atgggcaagg cggagatcct gaagtacatc 1080  
ctcagtcgtg agatcaagga gaagcggctc cggagcctgt ccaggaagt caccgactgg 1140  
gcgtacggac ccgtgtatc ctccctctac gaccitacca acgtggacac caccacggac 1200  
aactcagtgc tggaaatcac tgtctacaac accaacaatcg acaaccggca tgagatgctg 1260  
accttgagc cgctgcacac gctgctgcat atgaagtggg agaagttagc caagcacatg 1320  
ttctttctgt cttctgtctt ttatttcttc tacaacatca ccttgaccct cgtctctgac 1380  
taccgcccc gggaggagga ggccatcccg cacccttgg cctgacgca caagatgggg 1440  
tggctgcagc tcttagggag gatgtttgtg ctcatctggg ccatgtgcat ctctgtgaaa 1500  
gagggcatg ccatttctt gctgagaccc tcggatctgc agtccatcct ctggatgcc 1560  
tggttccact ttgtcttttt tatccaagct gtgctgtga tactgtctgt ctcttctgac 1620  
ttgtttgcct acaaagagta cctcgccctgc ctctgctgg ccatggccct gggctgggag 1680

aacatgctct actatacgcg gggttccag tccatgggca tgtacagcgt catgatccag 1740  
 aaggtcattt tgcattatgt tctgaagttc ttgtttgtat atatcgigt tttgcttggga 1800  
 ttggagtag ccttggccctc gcgatcgag aagtgtccca aagacaacaa ggactgcagc 1860  
 tcctacggca gcttcagcga cgcagtgtg gaactcttca agctcacat aggccctgggt 1920  
 gacctgaaca tccagcagaa ctccaagtat cccattctct ttctgttctt gctcatcacc 1980  
 tatgtcatcc tcacctttgt tctctctctc aacatgctca ttgctctgat gggcgagact 2040  
 gtggagaacg tctccaagga gagcgaacgc atctggcgcc tgcagagagc caggaccatc 2100  
 ttggagtitt agaaaatggt accagaatgg ctgaggagca gattccggat gggagagctg 2160  
 tgcaaagtgg ccgaggatga ttccgactg tgtttgcgga tcaatgaggt gaagtggact 2220  
 gaatggaaga cgcacgtctc ctctcttaac gaagacccgg ggctgttaag acgaacagca 2280  
 gatttcaaca aaatccaaga ttcttccagg aacaacagca aaaccactct caatgcattt 2340  
 gaagaagtcg aggaattccc ggaaacctcg gtgtag 2376

<210> 103

<211> 2373

<212> DNA

<213> Human

<400> 103

atgaaagccc accccaagga gatgggtcct ctcatgggca agagagtgtc tgccccagtt 60  
 gggaaccttg ccgtccgtgc agagaagagg ccggcgagga tcacccccac aaagaagagt 120  
 gcacacttct tcttgagat agaagggttt gaacccaacc ccacagtgtc caagacctct 180  
 cctccgtgtc tctccaagcc catggattcc aacatccggc agtgcatctc tggtaactgt 240  
 gatgacatgg actccccca gtctcttcaa gatgatgtga cagagacccc atccaatccc 300  
 aacagcccca gtgcacagt ggccaaggaa gagcagagga ggaaaaagag gcggctgaag 360  
 aagcgcatct ttgcagccgt gtctgagggc tgcgtggagg agttggtaga gttgttggtg 420  
 gagctgcagg agctttgcag gcggcgccat gatgaggatg tgcctgactt cctcatgcac 480  
 aagctgacgg cctccgacac ggggaagacc tgcttgaiga aggcttgtt aaacatcaac 540  
 cccaacacca aggagatagt gcggatccgt ctgtcctttg ctgaagagaa cgacatcctg 600  
 ggcaggttca tcaacgccga gtacacagag gaggcctatg aagggcagac ggcgctgaac 660

atcgccatcg agcggcggca gggggacatc gcagccctgc tcatcgccgc cggcgccgac 720  
gtcaacgcgc acgccaaggg ggccctcttc aaccccaagt accaacacga aggcctctac 780  
ttcgggtgaga cgccccctggc ccctggcagca tgcaccaacc agcccgagat tgtgcagctg 840  
ctgatggagc acgagcagac ggacatcacc tcgcgggact cagaggcaa caacatcctt 900  
cacgccctgg tgaccgtggc cgaggacttc aagacgcaga atgactttgt gaagcgcatg 960  
tacgacatga tcctactgcg gagtggcaac tgggagctgg agaccactcg caacaacgat 1020  
ggcctcacgc cgctgcagct ggccgccaag atgggcaagg cggagatcct gaagtacatc 1080  
ctcagtcgtg agatcaagga gaagcggctc cggagcctgt ccaggaagtt caccgactgg 1140  
gcgtacggac ccgtgcatc ctccctctac gacctacca acgtggacac caccacggac 1200  
aactcagtcg tggaaatcac tgtctacaac accaacatcg acaaccggca tgagatgctg 1260  
acctggagc cgctgcacac gctgctgcat atgaagtggga agaagtttgc caagcacatg 1320  
ttctttctgt cctctgctt ttatttcttc tacaacatca cctgaccct cgtctcgtac 1380  
taccgcccc gggaggagga ggccatcccg cacccttgg cctgacgca caagatgggg 1440  
tggctgcagc tcctagggag gatgtttgtg ctcacttggg ccatgtgcat ctcgtgaaa 1500  
gagggcattg ccatcttctt gctgagacc tcggatctgc agtccatcct ctcggatgcc 1560  
tggttccact ttgtcttttt tatccaagct gtccttggga tactgtctgt ctctttgtac 1620  
ttgtttgcct acaaagagta cctcgccctgc ctcgtgctgg ccatggccct gggctgggcg 1680  
aacatgctct actatacgcg gggtttccag tccatgggca tgtacagcgt catgatccag 1740  
aaggtcattt tgcatgatgt tctgaagtc ttgtttgtat atatcgtgtt ttgtcttggga 1800  
tttggagtag ccttggcctc gctgatcgag aagtgtccca aagacaaca ggactgcagc 1860  
tcctacggca gcttcagcga cgcagtgtg gaactcttca agctcacat aggcctgggt 1920  
gacctgaaca tccagcagaa ctccaagtat cccattctct ttctgttctt gctcatcacc 1980  
tatgtcatcc tcacctttgt tctcctctc aacatgctca ttgctctgat gggcgagact 2040  
giggagaacg tctccaagga gagcgaacgc atctggcgcc tgcagagagc caggaccatc 2100  
ttggagtitt agaaaatgtt accagaatgg ctgaggagca gattccggat gggagagctg 2160  
tgcaaagtgg ccgaggatga ttccgactg tgtttcgga tcaatgaggt gaagtggact 2220  
gaatggaaga cgcacgtctc ctctcttaac gaagaccgga ggccgtgaag acgaacagca 2280  
gatttcaaca aaatccaaga ttcttccagg aacaacagca aaaccactct caatgcattt 2340  
gaagaagtcg aggaattccc ggaaacctcg gtc 2373

&lt;210&gt; 104

&lt;211&gt; 373

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 104

Met Ser Thr Asp Cys Ala Gly Asn Ser Thr Cys Pro Val Asn Ser Thr  
5 10 15  
Glu Glu Asp Pro Pro Val Gly Met Glu Gly His Ala Asn Leu Lys Leu  
20 25 30  
Leu Phe Thr Val Leu Ser Ala Val Met Val Gly Leu Val Met Phe Ser  
35 40 45  
Phe Gly Cys Ser Val Glu Ser Gln Lys Leu Trp Leu His Leu Arg Arg  
50 55 60  
Pro Trp Gly Ile Ala Val Gly Leu Leu Ser Gln Phe Gly Leu Met Pro  
65 70 75 80  
Leu Thr Ala Tyr Leu Leu Ala Ile Gly Phe Gly Leu Lys Pro Phe Gln  
85 90 95  
Ala Ile Ala Val Leu Met Met Gly Ser Cys Pro Gly Gly Thr Ile Ser  
100 105 110  
Asn Val Leu Thr Phe Trp Val Asp Gly Asp Met Asp Leu Ser Ile Ser  
115 120 125  
Met Thr Thr Cys Ser Thr Val Ala Ala Leu Gly Met Met Pro Leu Cys  
130 135 140  
Leu Tyr Ile Tyr Thr Arg Ser Trp Thr Leu Thr Gln Asn Leu Val Ile  
145 150 155 160  
Pro Tyr Gln Ser Ile Gly Ile Thr Leu Val Ser Leu Val Val Pro Val  
165 170 175  
Ala Ser Gly Val Tyr Val Asn Tyr Arg Trp Pro Lys Gln Ala Thr Val

180 185 190  
Ile Leu Lys Val Gly Ala Ile Leu Gly Gly Met Leu Leu Leu Val Val  
195 200 205  
Ala Val Thr Gly Met Val Leu Ala Lys Gly Trp Asn Thr Asp Val Thr  
210 215 220  
Leu Leu Val Ile Ser Cys Ile Phe Pro Leu Val Gly His Val Thr Gly  
225 230 235 240  
Phe Leu Leu Ala Phe Leu Thr His Gln Ser Trp Gln Arg Cys Arg Thr  
245 250 255  
Ile Ser Ile Glu Thr Gly Ala Gln Asn Ile Gln Leu Cys Ile Ala Met  
260 265 270  
Leu Gln Leu Ser Phe Ser Ala Glu Tyr Leu Val Gln Leu Leu Asn Phe  
275 280 285  
Ala Leu Ala Tyr Gly Leu Phe Gln Val Leu His Gly Leu Leu Ile Val  
290 295 300  
Ala Ala Tyr Gln Ala Tyr Lys Arg Arg Gln Lys Ser Lys Cys Arg Arg  
305 310 315 320  
Gln His Pro Asp Cys Pro Asp Val Cys Tyr Glu Lys Gln Pro Arg Glu  
325 330 335  
Thr Ser Ala Phe Leu Asp Lys Gly Asp Glu Ala Ala Val Thr Leu Gly  
340 345 350  
Pro Val Gln Pro Glu Gln His His Arg Ala Ala Glu Leu Thr Ser His  
355 360 365  
Ile Pro Ser Cys Glu  
370

&lt;210&gt; 105

&lt;211&gt; 1119

&lt;212&gt; PRT



&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 105

atgagcacag actgtgcggg caactccacc tgccctgtca acagtacgga ggaagacccg 60  
cccgtgggaa tggagggccca tgcgaatcta aagctgcitt ttacagtgtc ctcggctgtg 120  
atgggtgggtt tggtcattgt ctccttttga tgttctgtgg agagtcagaa gcctctggttg 180  
cacctcagaa gaccttgggg catcgcatgt ggccctgcitt cccagtttgg acttaatgcct 240  
ctgacagctt atctgttagc cattggcttc ggtctgaaac cattccaagc tattgtctgc 300  
ctcatgatgg ggagctgccc tgggggcacc atctctaatt ttctcacctt ctgggttgat 360  
ggagataatg atctcagcat cagtatgaca acctgttcca cagtggccgc cctgggaatg 420  
atgcctctct gccctctacat ctacaccgg tccctggactc tgacacagaa cctcgtcatt 480  
ccgtatcaga gcataggaat tacccttctg tccctggctg ttctctgtgc ttctggcgtc 540  
tatgtgaatt ataggtggcc aaagcaagca acggctcatt tcaaggctcg agccattctg 600  
ggtggcatgc tcttctgtgt ggtggcagtt actggcatgg tccctggcaa aggctggaac 660  
acagacgtca ctcttctggt catcagctgc attttccctt tggctggcca tgtcacaggc 720  
ttctgtctgg cattctctac ccaccaatct tggcaaaggt gcaggacat ttccatagag 780  
actggcgctc agaacatcca gctgtgcac gccatgtgc agctgtcctt ctctgtctgag 840  
tacctggctc agctgtctaaa ctttgcattg gcctatggac tcttccaagt gctgcacggg 900  
ctgctcattg tcgcagcata tcaggcatac aagaggaggc agaagagtaa atgcaggaga 960  
cagcaccgg attgcccaga cgtctgtctc gagaagcagc ccagagagac cagtgccttc 1020  
ttggataaag gggatgaggc tgccgtaact ctggggccag tgcagccaga gcagcaccac 1080  
agggctgtct agctgactag ccacattcct tcatgtgaa 1119

&lt;210&gt; 106

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 106

gaccigccca gtgcttgcta ctca

24

<210> 107

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 107

tcttcactgg ccacggagga ggat

24

<210> 108

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 108

ctattgctgt cctcatgatg g

21

<210> 109

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 109

catgctgcag ctgtccttct c

21

<210> 110

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 110

ccatcatgag gacagcaata g

21

<210> 111

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 111

gagaaggaca gctgcagcat g

21

<210> 112

<211> 1237

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 112

gacctgcca gtgcttgcta ctcattgtcc ttigtgttcc tgtgttctaa ttcattgagag	60
gagatgagca cagactgtgc gggcaactcc acctgccctg tcaacagtac ggaggaagac	120
ccgcccgtgg gaatggaggg ccatgcgaat cttaaagctgc tttttacagt gctctcggct	180
gtgatggtgg gtttgggtcat gtctcttttt ggatgttctg tggagagtca gaagctctgg	240
ttgcacctca gaagaccctg gggcatcgca gtgggcctgc tttcccagtt tggacttatg	300
cctctgacag cttatctgtt agccattggc ttcggctctga aaccattcca agctattgct	360

71/92

gicctcatga tggggagctg ccttgggggc accatctcta atgttctcac ctcttgggtt 420  
gaaggagata tggatctcag catcagtaig acaacctgtt ccacagtggc cgccctggga 480  
atgatgcctc tctgcctcta catctacacc cggctctgga ctctgacaca gaacctcgtc 540  
attccgtatc agagcatagg aattaccctt gtgtccctgg tggttcctgt ggcttctggc 600  
gtctatgtga attatagggt gccaaagcaa gcaacggtca ttctcaaggt cggagccatt 660  
ctgggtggca tgcctctcct ggiggiggca gttactggca tggctctggc aaaaggctgg 720  
aacacagacg tcactcttct ggtcatcagc tgcattttcc ccttggctcg ccatgtcaca 780  
ggcttctctg tggcattcct caccaccaa tcttggcaaa ggtgcaggac catttcata 840  
gagactggcg ctgagaacat ccagctgtgc atcgccatgc tgcagctgtc ctctctgtct 900  
gagtacctgg tccagctgtt aaactttgca ttggcctatg gactcttcca agtctgtcac 960  
gggctgtctc ttgtcgcagc atatcaggca tacaagagga ggcagaagag taaatgcagg 1020  
agacagcacc cggattgccc agacgtctgc taccgagaagc agcccagaga gaccagtgtt 1080  
ttcttggata aaggggatga ggctgccgta actctggggc cagtgcagcc agagcagcac 1140  
cacagggtg ctgagctgac tagccacatt ccttcatgtg aatagtggga ggcacggacc 1200  
agcttggccc tccatcttcc tccgtggcca gtgaaga 1237

&lt;210&gt; 113

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 113

cttctggcgt ctatgtgaat tatagg

26

&lt;210&gt; 114

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 114

gagcatgccca cccagaatg

19

&lt;210&gt; 115

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Probe

&lt;400&gt; 115

caaagcaagc aacggtcatt ctcaaggtc

29

&lt;210&gt; 116

&lt;211&gt; 1046

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 116

gaagacccac ccgtgggaat ggagggacag gggagccctga agcttgtttt cacagtcctg	60
tcggctgtga tgggtgggtct ggtcatgttc tcctttggat gttcagtga gagtcggaag	120
ctctgggtgc acctcagaag accctggggc atcgcagtgg gcctgctttg ccagtttggg	180
ctcatgcctc tgacagctta tctgctagcc attggcttcg gtctgaaacc attccaagct	240
attgccgtcc tcatcatggg gagctgccct gggggcacccg tctctaattgt cctcaccttc	300
tgggttgatg gagatatgga cctcagcatc agcatgacga cctgctccac agtggctgct	360
ctgggaatga tgccccctctg cctctacgtc tacacccggt cctggactct tccacagagc	420
ctcaccatcc cgtaccagag cataggaatt acccttgtgt ccttggttgt tcctgtggcc	480
tccggcatct atgtgaatta taggtggcca aagcaagcaa cattcatctt caaggtcggg	540
gctgctgttg gcggcatgct cctcctggtg gtggcagtta ccggcgtggt cctggcaaaag	600

ggctggaaca tagatgtcac tcttcctggc atcagctgta ttttccctt ggtcggccat 660  
gicalgggct tcctgctggc gtctctcacc caccagctt ggcaaagggtg caggacgatt 720  
tccatagaga ccggagcaca gaacatccag ctgtgcatig ccatgatgca gctgtccttc 780  
tctgtctagt acctgggtcca gctgttaaac nncgcccctgg cctacggact ctccaagtg 840  
ctgcacgggc tgctcattgt cgcagcatat caggcataca agaggaggca gaagagtcaa 900  
tacaggagac agcaccgga gtgccaagac atcagctctg agaagcagcc cagagagacc 960  
agtgccttct tggataaagg ggctgaggct gctgttaactc tggggctaga gcagcaccac 1020  
aggaccgtg aactgaccag tcacgt 1046

<210> 117

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 117

atgagcgcag actgcgaggg caa 23

<210> 118

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 118

tcccactatt cacatgaagg aacg 24

<210> 119

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 119

tccggcatct atgtgaatta tagg

24

<210> 120

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 120

taactgccac caccaggagg

20

<210> 121

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 121

agcaagcaac attcattctc aaggtcgg

28

<210> 122

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 122

taggaagcctt gtcgacatga gagccaattg ttccag

36

<210> 123

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 123

aatgtctaga actagtctat tcacatgaag tgatgtgg

38

<210> 124

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 124

tagaaggcac agtcgagg

18

<210> 125

<211> 317

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 125

ccggaggaac ctgccaaaat caagcatcgt ttctttgtat aagaagctgg agatgaaaca

60



ggccattgag atggttagaga ctgggatact gagctctgtg gcttctccca caccctatca 120  
gtctgagagg atacagggaa tcaagcggct ttctcctgaa gacgtggagt ccatgcggga 180  
cattctgaca agaagcatgt accaagttcg acaaagaacc ctatcctaca acaaatacaa 240  
cctcaaacc caaacaagtg agaagcaagc caaagagatt ctgatccgic gccagaacac 300  
cttgagggag agcatgc 317

<210> 126

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 126

ccggaggaac ctgccaaaat caa

23

<210> 127

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 127

gcatgcctc cctcaagggtg ttctgg

26

<210> 128

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 128

gaigaaacag gccattgaga tg

22

<210> 129

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 129

gattccctgt atcctctcag actga

25

<210> 130

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 130

ctgggatact gagctctgtg gctt

24

<210> 131

<211> 363

<212> PRT

<213> Rat

<400> 131

tcgtgggatg cgggggagta tttttcggca tcatttttgg attcatitcc gcatttatca 60  
cacgtttcac tcagaacatc tctgcgatcg agcctctcat cgtcttcatg ttcagctatc 120

tgtcttactt agcagccgag acgctttatc tctccggaat cctggccatc acagcttgtg 180  
cagtgacaat gaaaaagtac giggaagaga acgigtccca gacgtcgtac acgaccatca 240  
agtacttcat gaagatgctg agcagcgtga gcgagaccct catcttcac ttcattgggcg 300  
tgtccaccgt tgggaagaac catgagtga acigggcttt cgtctgcttc accctggcct 360  
tct 363

<210> 132

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 132

tcgtgggaig cgggggagta ttt 23

<210> 133

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 133

agaaggccag ggtgaagcag acga 24

<210> 134

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 134

agcagccgag acgctttatc t

21

<210> 135

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 135

tctcttccac gtactttttc attgtc

26

<210> 136

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 136

aatcctggcc atcacagctt gtgca

25

<210> 137

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 137

gacaagctta tgcataatggc tctgcagatg ttcgt

35

<210> 138

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 138

gactctagaa ctagtctatt ttttttggag caaaggact

39

<210> 139

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 139

ctcctgccac ccatcgttct

20

<210> 140

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 140

gctggatgtg cccgattcat

20

<210> 141

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 141

catcagcgta ttgctctct 20

<210> 142

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 142

tccccaaga tcatcatgta 20

<210> 143

<211> 680

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 143

tccacggagc ctggagctac aaccgggtga ccaagtgtat cctgtactgt ttctacaaga 60  
atgtggtcct ctacatcatc gagctatggg tcgcccttgt gaatggattt tctgggcaga 120  
ttttattcga ggcctggcgc atcggcttgt acaatgtgat cttcacggca ttgccgccct 180  
tcactctggg gatcttcgag aggtcttgta ctacaggagag catgctcagg tccccacagc 240  
tttacagaat cactcagaac gctgaagggt tcaacactaa ggttttctgg ggtcactgca 300  
tcaatgcctt gggtcattcc ctcatcctct tctgggttcc catgaaagcg ctggagcatg 360

atactccagt aaccagcgtt catgccacag actatttgtt tgttggaaat attgtttaca 420  
cgtacgttgt ggttacagtt tgtttgaaag ctggtttggg gacgacagct tggacgaaat 480  
tcagtcacct ggcggtgtgg ggaagcatgc tgaatctggtt ggtgttcttt ggtgtctatt 540  
caaccaatctg gccgaccatc cccattgctc ctgacaatgaa agggcaggca actatgggtc 600  
tgagctctgc gtacttctgg tigggatigt tccigtgtcc gactgcgtgt ttgattgaag 660  
acgtggcgtg gagagcggcc 680

<210> 144

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 144

gccatcgac agttttccta cct 23

<210> 145

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 145

catcctcttt ccgttactgt ctcg 24

<210> 146

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 146

aaccatctgg ccgaccatc

19

<210> 147

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 147

acgcagagct caggaccata g

21

<210> 148

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 148

tgccctgcct ttcatgtcag gagc

24

<210> 149

<211> 771

<212> PRT

<213> Rat

<400> 149

gctgcttttg gtccatggag cctggagcta caaccgggtg accaagtgca tcctctactg

60



```

tttctataag aatgiggacc tctacatcat tgagctttgg ttgccttttg ttaatggatt 120
ttctggggcag attttatttg agcgctggcg catcggtttg tacaatgtga tcttcacagc 180
attgccaccc ttacactcgg ggatcttcga gaggtcgtgt actcaggaga gcatgctcag 240
gtttccacag cttacaaaaa tcactcagaa cgccgaaggt ttcaaacacga aggtttttctg 300
gggtcactgc atcaatgcct tggtcacacc cctcaccctc ttctgggttc caatgaaagc 360
gctggagcac gatactccgc taaccagtgg tcacgccaca gactatttgt ttgttggaaa 420
tatgttttac acgtacgttg tggtcacagt ttgtttgaaa gctggtttgg agacgacagc 480
ttggactaaa ttcagtcacc tggcagtggt gggaagcatg ctgacttggt tgggtttctt 540
tgggtgtctat tcaaccttct ggccgaccaa ccccatcgct cctgacaaga aagggcaggc 600
aactatgggc ctgagttctg cccacttctg gttgggtttg ctcttggttc ccactgcgtg 660
tttgatcgag gatgtggcgt ggagagcggc caaacacacc tgcaaaaaga cactgtctgg 720
aggaggttca ggagctggag accaagtccc gagtgtatgg gcaaagcgat g 771

```

&lt;210&gt; 150

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 150

tattcaacct tctggccgac c

21

&lt;210&gt; 151

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 151

accagaagtg ggcagaactc a

21

<210> 152

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 152

catagttgcc tgccctttca tgtcagga

28

<210> 153

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 153

ttggatccgt cgacatgtcc cgggccacgt ctgttgg

37

<210> 154

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 154

ccgcggccgc actagtttat ttcttcctgg atttcttttt ggt

43

&lt;210&gt; 155

&lt;211&gt; 1064

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 155

```
acagcctgag attgtgcagc tgctgatgga gaatgagcag acagacatcg cticccagga      60
ttcccgggga aacaacatcc tgcacgcgct ggtgacggtg gctgaggact tcaagactca      120
gaatgacttc gttaagcgca tgtatgacat gatcctgctg aggagtgga actgggagct      180
ggagaccaatg cgcaacaacg atgggctcac gccacigcag ctggctgcca agatgggcaa      240
ggctigagatc ctgaagtaca tcctcagccg cgagatcaag gagaagcctc tccggagctt      300
gtccaggaag ttacacggact gggcgtatgg gcctgtgtca tcctcactct atgacctcac      360
caatgtagac acaacgacgg ataactctgt gctggaaatc atcgtctaca acaccaacat      420
tgataaccga catgagatgc tgacctgga gcctctgcat acgctgctac acacgaaatg      480
gaagaaattt gccaagtaca tgtttctctt gtccttctgc ttctatttct tctacaacat      540
cacccigacc ctgtctctt actaccgtcc tcgggaagat gaggatctcc cacaccctt      600
ggccctigaca cacaaaatga gtiggcttca gctcctaggg aggatgtttg tcctcatctg      660
ggccacatgc atctctgtga aagaaggcat tgccatttcc ctgctgagac cctccgatct      720
tcagtccatc ctgtcagatg cctggtttca ctttgtcttt ttgtccaag ctgtacttgt      780
gatactgtct gtattcttgt acttgtttgc ctacaaagaa tacctcgctt gcctcgtgct      840
ggccatggcc ctgggctggg cgaacatgct ctactacacg agaggcttcc agtctatggg      900
catgtacagc gtcatgatcc agaaggatcat ttgcatgat gtcctcaagt tcttgtttgt      960
ttacatcctg ttcttacttg gatttggagt agcgctggcc tcactgattg agaagtgtc      1020
caaggacaaa aaggactgca gttcctatgg cagcttcagc gaca                        1064
```

&lt;210&gt; 156

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Primer

<400> 156

gcgtgtacta accagcctga gattgtg

27

<210> 157

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 157

gtcgctgaag ctgcatagg aactg

25

<210> 158

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 158

ctgagaccct ccgatcttca gt

22

<210> 159

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 159

ggcaggcgag gtattctttg ta

22

<210> 160

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 160

ccgtgcagat gcctggtttc actttgtctt

30

<210> 161

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 161

cggggtaccg tcgacatgaa agcccacccc aagg

34

<210> 162

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 162

atttgcggcc gcactagtct acaccgaggt ttccggg

37

<210> 163

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 163

taatacgact cactataggg

20

<210> 164

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 164

gacacgggga agacctgcct gatg

24

<210> 165

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 165

gtggcaactg ggagctggag acc

23

<210> 166

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 166

gggccatgtg catctctgtg aaag

24

<210> 167

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 167

ctgatgggcg agactgtgga g

21

<210> 168

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 168

tagaaggcac agtcgagg

18

<210> 169

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 169

ciccacagtc tgcgccatca g

21

<210> 170

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 170

cittcacaga gatgcacatg gccc

24

<210> 171

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 171

ggtctccagc tcccagttgc cac

23

<210> 172

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer



<400> 172

caicaggcag gtcttccccg tgtc

24

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/00311

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/47, 16/18, C12N15/12, 15/63, 5/10, A61K38/00,  
39/00, 48/00, G01N33/53, C12P21/02, 21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/47, 16/18, C12N15/12, 15/63, 5/10, A61K38/00,  
39/00, 48/00, G01N33/53, C12P21/02, 21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KAWAI, J. et al., Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection. Nature, 08 February, 2001 (08.02.01), Vol.409, No.6821, pages 685 to 690, Database GenBank Accession No.AK018423	1-20,23-24
P,X	WO 02/33087 A2 (CURAGEN CORP.), 25 April, 2002 (25.04.02), & AU 200216637 A	1-20,23-24
P,X	WO 02/072774 A2 (LEXICON GENETICS INC.), 19 September, 2002 (19.09.02), & US 2002/164327 A1	1-20,23-24
P,X	WO 02/077237 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.), 03 October, 2002 (03.10.02), (Family: none)	1-20,23-24



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search  
22 April, 2003 (22.04.03)

Date of mailing of the international search report  
13 May, 2003 (13.05.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/00311

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/04520 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.), 17 January, 2002 (17.01.02), & AU 200173239 A	30-47, 50-51
X	Orlowski J. et al., Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. J.Biol.Chem., 05 May, 1992 (05.05.92), Vol.267, No.13, p.9331-9	30-47, 50-51
P, X	WO 02/10216 A2 (CURAGEN CORP.), 07 February, 2002 (07.02.02), & US 2003/064369 A1	30-47, 50-51
X	Halleck MS. et al., Differential expression of putative trans bilayer amphipath transporters. Physiol Genomics, 11 November, 1999 (11.11.99), Vol.1, No.3, p.139-50	57-74, 77-78
P, X	EP 1225182 A2 (Millennium Pharmaceuticals, Inc.), 24 July, 2002 (24.07.02), & US 2002-119523 A1	57-74, 77-78
P, X	WO 02/101045 A2 (NOVARTIS AG & IRM LLC), 19 December, 2002 (19.12.02), (Family: none)	57-74, 77-78
X	WO 02/00722 A2 (Millennium Pharmaceuticals, Inc.), 03 January, 2002 (03.01.02), & US 2002/156253 A1 & EP 1294762 A2	84-101, 104-105, 108-110
P, X	WO 02/12340 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.), 14 February, 2002 (14.02.02), & AU 200180981 A	84-101, 104-105, 108-110
P, X	WO 02/44210 A2 (BRISTOL-MYERS SQUIBB CO.), 06 June, 2002 (06.06.02), & US 2003/027164 A1	84-101, 104-105, 108-110
P, X	GB 2372993 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP & SMITHKLINE BEECHAM PLC), 11 September, 2002 (11.09.02), & US 2003/027232 A1	84-101, 104-105, 108-110

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/00311

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 28, 55, 82, 114

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 28, 55, 82 and 114 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☒ Claims Nos.: (the following A)

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

(A) Claims 21-22, 25-27, 29, 48-49, 52-54, 56, 75-76, 79-81, 83, 102-103, 106-107, 111-113 and 115.

(B) See extra sheet.

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1 to 29 relate to a novel sodium-dependent bile acid transporter protein, claims 30 to 56 relate to a novel  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange transporter protein, claims 57 to 83 relate to a novel P-type ATPase and claims 84 to 115 relate to a novel vanilloid receptor protein. At the point of the application of the present case, various sodium-dependent bile acid transporter proteins,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange transporter proteins, P-type ATPases and vanilloid receptor proteins were already known in public and these claims are not considered as having a special technical feature in common. Such being the case, these inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

The compounds as set forth in claims (1) (21, 25, 29, 48, 52, 56, 75, 79, 83, 102, 106, 111 and 115) and the medicinal compositions as set forth in claims (2) (22, 26-27, 49, 53-54, 76, 80-81, 83, 103, 107 and 112-113) are specified by "the screening methods as set forth in claims (18, 23, 46, 50, 73, 77, 100, 104 and 109) and, therefore, involve any compounds and medicinal compositions obtained by the screening methods.

However, the description presents neither any specific compounds nor medicinal compositions obtained by the screening methods. Therefore, the claims (1) and (2) are neither disclosed in the meaning as described in PCT Article 5 nor supported by the description in the meaning as described in PCT Article 6. Even though the common technical knowledge at the point of the application is considered, it is completely unknown what specific compounds are involved therein and what are not. Thus, the above claims are described in an extremely unclear manner and fail to fulfill the requirement of clearness as described in PCT Article 6.

Such being the case, no meaningful search can be made on the inventions as set forth in the above claims.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K14/47, 16/18, C12N15/12, 15/63, 5/10,  
A61K38/00, 39/00, 48/00, G01N33/53, C12P21/02, 21/08

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K14/47, 16/18, C12N15/12, 15/63, 5/10,  
A61K38/00, 39/00, 48/00, G01N33/53, C12P21/02, 21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,  
MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Kawai J. et al., Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection. Nature 2001 Feb 8, Vol. 409, No. 6821, p. 685-690, Database GenBank Accession No. AK018423	1-20, 23-24
P X	WO 02/33087 A2 (CURAGEN CORPORATION) 2002. 04. 25 & AU 200216637 A	1-20, 23-24
P X	WO 02/072774 A2 (LEXICON GENETICS INCORPORATED) 2002. 09. 19 & US 2002/164327 A1	1-20, 23-24

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 04. 03

国際調査報告の発送日

13.05.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子

4N

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	WO 02/077237 A2(ENCYTE GENOMICS, INC.)2002. 10. 03 ファミリーなし	1-20, 23-24
X	WO 02/04520 A2(ENCYTE GENOMICS, INC.)2002. 01. 17 & AU 200173239 A	30-47, 50-51
X	Orlowski J. et al., Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. J Biol Chem 1992 May 5, Vol. 267, No. 13, p. 9331-9	30-47, 50-51
P X	WO 02/10216 A2(CURAGEN CORPORATION)2002. 02. 07 & US 2003/064369 A1	30-47, 50-51
X	Halleck MS. et al., Differential expression of putative trans bilayer amphipath transporters. Physiol Genomics 1999 Nov 11, Vol. 1, No. 3, p. 139-50	57-74, 77-78
P X	EP 1225182 A2(Millennium Pharmaceuticals, Inc.)2002. 07. 24 & US 2002/119523 A1	57-74, 77-78
P X	WO 02/101045 A2(NOVARTIS AG & IRM LLC)2002. 12. 19 ファミリーなし	57-74, 77-78
X	WO 02/00722 A2(Millennium Pharmaceuticals, Inc.)2002. 01. 03 & US 2002/156253 A1 & EP 1294762 A2	84-101, 104- 105, 108-110
P X	WO 02/12340 A2(ENCYTE GENOMICS, INC.)2002. 02. 14 & AU 200180981 A	84-101, 104- 105, 108-110
P X	WO 02/44210 A2(BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY)2002. 06. 06 & US 2003/027164 A1	84-101, 104- 105, 108-110
P X	GB 2372993 A(SMITHKLINE BEECHAM CORP & SMITHKLINE BEECHAM PLC)2002. 09. 11 & US 2003/027232 A1	84-101, 104- 105, 108-110

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 28, 55, 82, 114 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲 28, 55, 82, 114 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 第17条(2)(a)(i) 及び PCT 規則 39.1 (iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☒ 請求の範囲 (下記 A) は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり (下記 B)、  
(A) 請求の範囲 21-22, 25-27, 29, 48-49, 52-54, 56, 75-76, 79-81, 83, 102-103, 106-107, 111-113, 115  
(B) 特別ページ参照
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 1-29 は新規ナトリウム依存性胆汁酸トランスポートタンパク質に関するもの、請求の範囲 30-56 は新規  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体タンパク質に関するもの、請求の範囲 57-83 は新規 P 型 ATPase に関するもの、請求の範囲 84-115 は新規バニロイド受容体タンパク質に関するものである。本願出願時、ナトリウム依存性胆汁酸トランスポートタンパク質、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体タンパク質、P 型 ATPase、バニロイド受容体タンパク質は種々公知であり、またそれらの請求の範囲群が特別な技術的特徴を共有するものとはいえないから、これらの一群の発明は単一の一般的発明概念を形成するように連関しているとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



(第 I 欄、2 (B) について)

請求の範囲① (21, 25, 29, 48, 52, 56, 75, 79, 83, 102, 106, 111, 115) に記載の化合物、

請求の範囲② (22, 26-27, 49, 53-54, 76, 80-81, 83, 103, 107, 112-113) に記載の医薬組成物は、「請求の範囲 (18, 23, 46, 50, 73, 77, 100, 104, 109) のスクリーニング方法」によって特定されており、当該スクリーニング方法で得られるあらゆる化合物及び医薬組成物を包含するものである。

しかしながら、明細書には、当該スクリーニング方法で得られる化合物及び医薬組成物としての具体的なものが一切記載されていないから、請求の範囲①、②は、PCT 5 条の意味での開示を欠き、また、PCT 6 条の意味での明細書の開示による裏付けを欠いている。さらに、出願時の技術常識を勘案しても具体的にどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのかが全く不明であって、前記請求の範囲は著しく不明確であり、PCT 6 条における明確性の要件も欠いている。

したがって、前記請求の範囲に記載された発明について有意義な調査をすることができない。